Experimentelle Untersuchungen über die Infektion mit Trypanosoma cruzi – dem Erreger der Chagaskrankheit des Menschen – in der Trag- und Lactationszeit der Maus

Rüdiger Disko

1960

Kurfürstendruck
Dipl.-Kfm. A. Koch
8 München 13 · Kurfürstenplatz 6
Fernsprecher 34 21 49/39 99 38

Aus dem Institut für Infektions- und Tropenmedizin
der Universität München

Experimentelle Untersuchungen über die Infektion mit Trypanosoma cruzi - dem Erreger der Chagas-krankheit des Menschen - in der Trag- und Lactationszeit der Maus

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München
vorgelegt von

Rüdiger Disko
aus
München

München 1968

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof.Dr.A.Herrlich
Mitberichterstatter: Prof.Dr.H.Eyer
Dekan: Prof.Dr.F.Marguth

Tag der mündlichen Prüfung: 1.10.1968

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

INHALTSVERZEICHNIS

I.) Einleitung 1

A) T. cruzi 1

a) Historisches 1

b) Geograph. Verbreitung und Häufigkeit der Chagaskrankheit 1

c) Systematik 2

d) Morphologie und Entwicklung 2

Formwechsel im Überträger 3

Formwechsel im Säugetier (Menschen) 3

e) Epidemiologie 6

Das natürliche Wirtsspektrum 6

Das experimentelle Wirtsspektrum 6

Infektionsmodus 6

Virulenz der Trypanosomen 6

f) Pathologie 7

Akute Phase 7

Chronische Phase 7

Pathogenese 8

Versuchstiere 9

g) Therapie der Chagaskrankheit 10

B) Problemstellung der eigenen Arbeit 11

II) Material und Methoden

Methoden des formalen und des kausalanalytischen Teiles 13

A) Die Versuchstiere 13
a) Der Mäusestamm 13
b) Trächtige Tiere 13
c) Jungtiere 13
d) Unterbringung der Mäuse 13
e) Futter 14
B) Der Trypanosomenstamm 15
C) Blutentnahme und Übertragung 15
a) Blutentnahme zur Passage 15
b) Berechnung einer beliebigen Trypanosomenzahl für ein beliebiges Inokulationsvolumen nach dem Prinzip des "inversen Dreisatzes" 16
c) Blutentnahme zur Parasitenzählung 22
d) Technik des "Dicken Tropfens" 22
e) Xenodiagnose 22
D) Fixierung und Verdünnung des Blutes 23
E) Zählung der Parasiten 23
a) Mikroskop 23
b) Gleichmäßig - wechselnde Zählweise 24
F) Mathemat. - statist. Methoden 24
a) Versuchsplanung 24
b) Parasitämiekurven 25
c) Quantitative Auswertung 25
d) Ausreißer Problem 27

Methoden des kausalanalytischen Teiles 27
a) Zur Frage einer immunbiologischen Ursache 27
b) Hormonversuch mit Prolactin 27
c) Nutritive Einflüsse 28
d) Differential - Blutbilder verschiedener Mäusegruppen 30
III) ERGEBNISSE 31
A) Versuche formaler Art 31
a) Vergleich trächtiger Mäuse mit Normaltieren 31
b) Vergleich lactierender, unmittelbar nach der Geburt infizierter Mäuse mit Normaltieren 35
c) Vergleich lactierender, am 10. Tage nach der Geburt infizierter Mäuse mit lactierenden, unmittelbar nach der Geburt infizierten Tieren 40
d) Einfluß der Entfernung der Jungen von der Mutter unmittelbar nach der Geburt und unmittelbar vor der Infektion auf den Krankheitsverlauf 45
e) Untersuchung des Krankheitsverlaufes von acht Tage nach Beendigung der Lactation infizierten Mäusen 49
f) Einfluß verschiedener Jungenzahlen auf den Krankheitsverlauf lactierender Mäuse 53

g) Versuch mit gestuften Parasitendosen in Normalmäusen 57

h) Infektion lactierender Mäuse mit niedrigeren Parasitendosen als bisher (Konsequenzen aus Versuch g) 67

i) Deckversuch mit den sechs überlebenden weiblichen Mäusen der Gruppe IIa' von Versuch h). 73

j) Ermittlung der präpartalen Trypanosomenzahl / mm^3 Blut von lactierenden Mäusen und weiblichen Normaltieren - Untersuchung der Verteilung 74

k) Zur Frage der Abwehrlage von Jungen infizierter lactierender Mäuse gegenüber T. cruzi 80

B) Einige canalanalytische Versuche zur T. cruzi - Infektion in der Lactation 83

a) Zur Frage einer immunbiologischen Ursache 83

b) Hormonversuche mit Prolactin 89

c) Nutritive Einflüsse 93

d) Differential - Blutbilder verschiedener Mäusegruppen 101

IV.) DISKUSSION 105

A) Material und Methoden 105

B) Diskussion der Ergebnisse 111

a) Versuche formaler Art 111

b) Kausalanalytischer Teil der Versuche zur T.-cruzi-Infektion in der Lactation 122

V.) ZUSAMMENFASSUNG 136

VI.) LITERATURVERZEICHNIS 142

I) EINLEITUNG

A) Trypanosoma cruzi CHAGAS 1909

- Erreger der Chagaskrankheit-

a) Historisches

Das Trypanosoma cruzi wurde im Jahre 1908 von Carlos Chagas in Brasilien im Darm einer Raubwanze (Panstrongylus megistus) entdeckt. Infizierte Wanzen wurden an einem Seidenpinseläffchen (Hapale penicillata) gefüttert: Wenige Wochen danach traten Trypanosomen im Blut des Tierchens auf. Die Parasiten waren auf eine Reihe anderer Tierarten übertragbar. Später fand Chagas das Trypanosom auch im Blut eines Kindes, das an einer sehr schweren, in vielen Teilen Brasiliens wohlbekannten, besonders bei Kindern oft tödlich endenden Krankheit litt.

b) Geographische Verbreitung und Häufigkeit der Chagaskrankheit:

Das Trypanosom ist in großen Teilen Süd- und Mittelamerikas als sehr verbreiteter Parasit in Raubwanzenarten (Reduviidae) heimisch. - Obwohl mit T. cruzi infizierte Raubwanzen und Säugetiere im Süden der Vereinigten Staaten nicht selten sind, wurden dort nur einzelne Fälle menschlicher Chagaskrankheit beschrieben:1955 der erste- durch Zufall entdeckte- akute Chagasfall durch WOODY und WOODY (155) . Eine neuere umfangreiche Untersuchung liegt von LAUGHROP und ORLOSKY (85) sowie KAGAN et al. (65) vor.- In der nordamerikanischen

Literatur finden sich nach KÖBERLE (67) auffallend viele Fälle von Megaoesophagus, Megacolon und idiopathischer Myocarditis, die nach Ansicht dieses Autors eine Chagasätiologie vermuten lassen.- In Europa kann die Chagaskrankheit eingeschleppt gelegentlich als Laboratoriumsinfektion auftreten. (110) Die Chagaskrankheit scheint im südlichen Amerika weit häufiger zu sein als man noch vor wenigen Jahrzehnten annahm. Beispielsweise wurden für das Jahr 1959 in Brasilien 4 Millionen Chagaskranke geschätzt (67). KÖBERLE (67) gibt im Jahre 1959 für das Obduktionsgut des Pathologischen Institutes Sao Paulo die Chagaskrankheit in 46 (!) der Fälle als Todesursache an. Auf Grund neuerer serologischer Untersuchungen hält auch MAEKELT (95, 96) diese Krankheit für weit häufiger als man bisher vermutete.

c) Systematik:

Eine Revision der Klassifikation des Genus Trypanosoma wurde von HOARE (49-53) vorgeschlagen. Seine Einteilung beruht auf der wahrscheinlichen Stammesgeschichte dieser Organismen. HOARE sieht T. cruzi als eine Art des Subgenus Schizotrypanum der großen Sektion "Stercoraria" an, bei der die Infektion immer durch den parasitenhaltigen Kot des Wirtstieres zustandekommt.

d) Morphologie und Entwicklung

Die Gestalt der Blutform von T. cruzi (Abb. 1; 1-2) gleicht grundsätzlich der anderer Trypanosomenarten des Menschen. Zur Darstellung eignet sich am besten die

Giemsa-Färbung. Länge des Parasiten einschließlich Geißel:ca. 20μ. (Erythrocyten - Durchmesser : 7,5μ). Auffällig ist ein endständiger, sehr großer runder Blepharoplast.

α) Formwechsel im Überträger:

Blutsaugende Wanzen der Gattungen Triatoma, Panstrongylus und Rhodnius dienen als Überträger. Die mit dem Blut von Säugetieren oder vom Menschen aufgenommenen Trypanosomen entwickeln sich im Mitteldarm zu Crithidia - Formen (Abb. 1; 3-4) . Sich längsteilend breiten sie sich in den Enddarm aus und werden dort zu infektiösen metazyklischen Trypanosomen (Abb.1; 7-9) von Größe und Aussehen der Blutform. Im Enddarm sind sie massenweise zu finden und werden mit dem Kot der Wanzen ausgeschieden. T. cruzi ist allerdings noch so weitgehend an das Leben im Insekt angepaßt, daß für seinen Fortbestand der Aufenthalt im Säugetier nicht unbedingt erforderlich ist. Infizierte Wanzen bleiben deshalb das ganze Leben lang infektiös. Stammhaltungen sind deshalb auch in Wanzen möglich.

β) Formwechsel im Säugetier (Menschen):

Die Vermehrung der mit dem Wanzenkot auf das Wirbeltier übertragenen Trypanosomen erfolgt dort intrazellulär auf dem Leishmania-Stadium. Es besteht also ein grundsätzlicher Unterschied zu den Erregern der afrikanischen Schlafkrankheit, der brucei- Gruppe. Auf Lymph- und Blutweg (Abb. 1; 10) gelangen die Parasiten in die Organe.- Am häufigsten sind die Leishmania - Formen in den Zellen des Reticuloendothels von Leber, Milz und lymphatischem Gewebe anzutreffen. Ferner in Herz-, glatter

und Skeletmuskulatur (Abb.1; 11), Nervensystem, Nebennieren und Gonaden. Durch mehrfache Zweiteilungen entstehen intrazelluläre Parasitenhaufen, die zu einer Ausweitung der Zellen führen (parasitäre "Pseudocysten"). Die Pseudocysten platzen bald und entlassen die Parasiten. Ob die Entwicklung im höheren Organismus - entsprechend der Abbildung (Abb. 1; 12) - über ein Crithidia-Stadium verläuft, wird neuerdings von LLKELES (29) bestritten.- Die Krankheit verläuft unter ständigem Wechsel von Blutinfektion und Gewebsbefall. Interessante Beobachtungen über das Verhältnis der Leishmania zur Trypanosomaform wurden von DOMINGUEZ und JAFFÉE (25) gemacht.

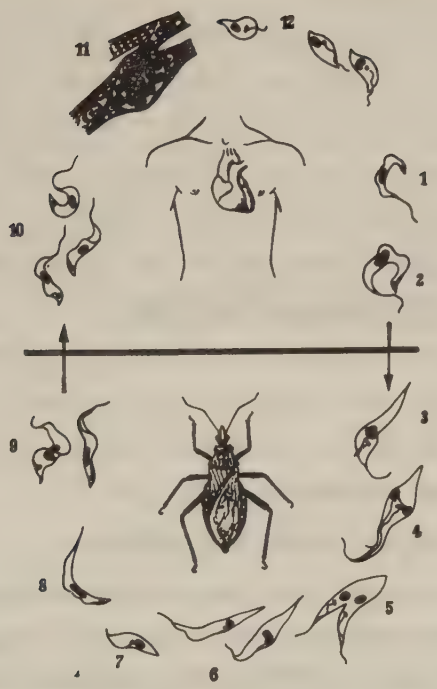


Abb. 1: Trypanosoma cruzi. Schematische Darstellung des Entwicklungscyclus. Trypanosomen aus menschlichem Blut (1 und 2) werden aufgenommen und verwandeln sich im Darm von Triatoma-Arten in Crithidia-Stadien (3-4), sie vermehren sich (5-6) und werden im Enddarm zu metacyclischen Trypanosomen (7-9). Im Menschen gelangen sie auf dem Blutwege (10) in die Organe und werden z.B. in der Muskulatur zu Leishmania-Formen (11). Auf diesem Stadium vermehren sie sich lebhaft, wandeln sich zu Crithidia- und Trypanosoma-Formen um (12) und treten im Blut als Trypanosomen auf.(Tryp.etwa 1200mal) (nach MEKARSKI; 1 ?)

e) Epidemiologie:

Es sind im endemischen Gebiet nicht nur zahlreiche Wanzenarten von T. cruzi befallen, sondern stets auch ein erheblicher Anteil der jeweiligen Population (oft über 40 %). Die Wanzen infizieren sich nicht so sehr durch Blutsaugen an chagaskranken Tieren oder Menschen als vielmehr untereinander durch Koprophagie und "Kannibalismus".

α) Das natürliche Wirtsspektrum

ist breit: in erster Linie Gürteltiere, ferner Beutelratten, Affen, Fledermäuse, Hunde, Katzen, Ratten, Mäuse usw. In den USA sind es besonders Waldratten (Neotoma), Opossums, Waschbären und Gürteltiere.

β) Das experimentelle Wirtsspektrum

umfaßt praktisch alle Laboratoriumstiere. Sogar die für die afrikanischen Trypanosomenarten unempfänglichen Paviane lassen sich infizieren. Besonders empfänglich und deshalb für Experimente sehr geeignet ist die Maus.

γ) Infektionsmodus

Die übliche Art der Übertragung von T. cruzi erfolgt durch infektiösen Wanzenkot. Er wird in die Stichwunde oder nachts - besonders von Kindern - in den Bindehautsack gerieben. Das geschieht leicht, da die Wanzen während des Stechens Kot absetzen. Der bevorzugte Ort des Saugens ist das Gesicht.

δ) Virulenz der Trypanosomen

Die aus Menschen, Tieren und Wanzen isolierten T. cruzi-Stämme weisen erhebliche Unterschiede in der Virulenz auf.

Es besteht bei den einzelnen Stämmen ein unterschiedlicher Histotropismus. Bereits 1914 konnten MAYER und ROCHA LIMA (103) zeigen, daß oft eine deutliche Bevorzugung der Muskulatur besteht, auch daß der Befall der einzelnen Gewebearten nicht nur von Stamm zu Stamm , sondern auch von Tierart zu Tierart stark wechselt. Von Bedeutung sind auch die Wirtspassagen: Passagen von Insekt zu Insekt beispielsweise führen zu einer Virulenzschwächung.

f) Pathologie:

Unterschieden werden eine akute und eine chronische Phase der Chagaskrankheit.

α) Akute Phase:

Beim Menschen zeigt sich das klinische Bild einer allgemeinen akuten Infektion: bei massenhaftem Parasitenauftreten im Blut ödematöse, entzündliche Schwellungen im Gesicht, (besonders an der Eintrittsstelle der Parasiten-Romañasches Zeichen), Lymphknoten-, Leber- und Milzvergrößerungen, Herzdilatationen mit Tachykardie. Kennzeichnend ist Fieber mit plötzlichem Beginn, in der Regel etwa vierzehn Tage nach der Infektion. Es ist intermittierend mit zwei täglichen Spitzen. Unter dem Zeichen der Herzschwäche oder einer Meningoencephalitis kann - wieder besonders bei Kindern - nach wenigen Wochen der Tod eintreten. Die Letalität liegt derzeit bei 10%.

β) Chronische Phase:

Der Parasitennachweis im Blut und Gewebe ist besonders in fortgeschrittenen Stadien schwierig. Unter entsprechenden klinischen Symptomen sind insbesondere Herzmuskulatur, ZNS, Schilddrüse und Nebenniere befallen.- Für die chronische Phase der Chagaskrankheit sind "Megabildungen"("Megas")

muskulärer Hohlorgane bezeichnend: Megaoesophagus, Megagaster, Megacolon, Cor bovinum usw.- KÖBERLE (66,67) schlägt für diese der Chagskrankheit eigentümlichen Erweiterungen muskulärer Hohlorgane die Bezeichnung "Enteromegalie" vor. - Eine sehr häufige Todesursache bei chronischem Chagasleiden ist plötzlicher Herztod.

7) Pathogenese:

Nach KÖBERLE (67) ist die Chagaskrankheit ihrem Wesen nach eine Krankheit des Nervensystems mit selektiver Zerstörung der Ganglienzellen. Da sich die Parasiten besonders in der Muskulatur ansiedeln, vornehmlich eine Krankheit der neurovegetativen Peripherie im Bereich der muskulären Hohlorgane.

Es bestehen zeitliche Differenzen in der endgültigen Reifung der Parasiten in den intrazellulären Pseudocysten. Platzen sie, so enthalten sie neben Trypanosomen noch zahlreiche Parasiten der Leishmaniaform. Die Leishmanien gehen in der Umgebung der Pseudocyste zugrunde und führen hier nach KÖBERLE zu schweren Ganglienzellzerstörungen. Die Vernichtung der Ganglienzellen erfolgt in der akuten Phase, nicht in der chronischen. Folge der Schäden am autonomen Nervensystem der betreffenden muskulären Hohlorgane ist partielle oder totale Denervierung. Sie führt als wesentliche Ursache im Verein mit der Belastung dieser muskulösen Hohlorgane zur "Megabildung".- Für die Cardiomegalie gilt dasselbe.- Schäden am ZNS werden ebenfalls durch zugrundegegangene Rundformen aus den Pseudocysten verursacht. - Über den biochemischen Fundamentalvor-

gang herrscht noch keine Einmütigkeit. Eine führende Rolle scheint ein als Chagastoxin bezeichnetes Lipopolysaccharid zu spielen (SENECA, 141 - 143)

δ) Versuchstiere:

Im Tierexperiment sind - sieht man vom Romaña'schen Zeichen ab (102) - die für die Chagaskrankheit charakteristischen pathol gischen Erscheinungen ebenfalls zu beobachten. Auch Mäuse zeigen etwa die eigentümlichen "Megabildungen" . Die Veränderungen im Verlauf der Krankheit bei diesen Tieren sind u. a. von OKUMURA et al. (121) und OKUMURA und CORREA NETO (122) und FREDERICI (32) studiert worden.

Der Infektionsverlauf wird nicht nur vom Virulenzgrad und den pathogenen Eigenschaften der verwendeten Trypanosomenstämme bestimmt, sondern auch von der Art, ja dem Zuchtstamm der Versuchstiere, deren Alter, Gewicht und auch dem Infektionsmodus. (Ausführliche Zusammenfassung bei PIEKARSKI und MESKE, 128).

Die bei unseren im folgenden beschriebenen Versuchen der Krankheit erlegenen Mäuse endeten meist mit einer schlaffen Lähmung der hinteren Extremitäten bei starker Abmagerung. Vorrausging ein Rigor mit spastischem Gang.-

PHILLIPS (126) konnte die Beobachtung HAUSCHKA'S (45) bestätigen, daß die Trypanosomen des WBH- Stammes den Herzmuskel nur wenig angreifen; viel mehr Leber, Niere, Milz und Skeletmuskulatur.

g) Therapie der Chagaskrankheit:

Eine befriedigende spezifische Therapie der Chagaskrankheit ist sehr im Gegensatz zu den Heilerfolgen bei den afrikanischen Trypanosomenerkrankungen des Menschen und der Haustiere unbekannt. Die Schwierigkeit liegt offenbar in der Bekämpfung der intrazellulären Leishmaniaformen. Tauglich sind beispielsweise Primaquin im akuten Frühstadium und noch mehr Bayer 7602 Lc^{R} (Dimethyl-amino-chinolylmelanin).

Einen Fortschritt in der Bekämpfung der übertragenden Raubwanzen stellt das in jüngster Zeit von den Bayer-Werken in den Handel gebrachte Insektizid Propoxur (2- Isopropoxy- phenyl-N-methylcarbamat; Baygon^{R}, Blattanex^{R}) dar.

B) Problemstellung der eigenen Arbeit

Bei systematischen Feldstudien der Blutparasiten freilebender kleiner Säugetiere auf Sizilien hatte KRAMPITZ u.a. Gelegenheit, sich mit dem Vorkommen von Trypanosoma duttoni in Hausmäusen dieser Insel zu beschäftigen (75).- T. duttoni kommt natürlicherweise nur in der Hausmaus vor und ist lokal vorzugsweise in Mittelamerika und im Mittelmeergebiet verbreitet; in Mitteleuropa fehlt es wahrscheinlich. Das Trypanosom wird durch Flöhe übertragen, ist apathogen und hinterläßt bei der Maus eine lebenslängliche sterile Immunität.

KRAMPITZ fiel bei seinen Studien auf Sizilien besonders eine relativ hohe Parasitämie von T. duttoni in trächtigen Hausmäusen auf. Der Befund gab ihm Anlaß zu systematischen Laboratoriumsforschungen (76). Die erfolgreiche Übertragung dieses Parasiten auf weiße Mäuse brachte die Entdeckung einer endogenen Synchronisation der Fortpflanzung von Wirt und Parasit. Infektion der Tiere zwischen dem 5. und 14. Trächtigkeitstag ergab gegenüber normalen weiblichen Kontrollmäusen ein regelmäßiges, außerordentlich hohes Anwachsen der Parasitenzahlen im peripheren Blut sowie oft auch eine verlängerte Dauer der Parasitämie. Die extrem hohen Parasitenzahlen bzw. die Parasitämie über den 22. Tag nach der Infektion hinaus kann umgekehrt auch als Trächtigkeitszeichen gewertet werden. Vor dem 5. und nach dem 14. Trächtigkeitstag infizierte Tiere zeigten gegenüber Kontrollen keine signifikante Differenz in Grad und Dauer der Parasitämie. Das ist eine klare

Kopplung an den Zeitraum der Embryogenese, an die Zeit der Ausbildung des Trophoblasten.- Experimente zur kausalen Klärung dieser bemerkenswerten Entdeckung werden von KRAMPITZ gegenwärtig noch durchgeführt.

Ist die Parasitämie von T. duttoni extrem hoch, finden sich vermehrt Würfe mit toten Jungen. KRAMPITZ gelang weiterhin der Beweis der Möglichkeit pränataler Infektion mit T. duttoni (76) .- In diesem Zusammenhang erscheint die häufige Beschreibung connataler Trypanosoma-cruzi- Infektionen des Menschen, zusammenfassend dargestellt durch APT (3) , von großem Interesse. Die Befunde von KRAMPITZ bei T. duttoni gaben Anlaß zu ähnlichen experimentellen Untersuchungen mit T. cruzi und der weißen Maus. Dabei lieferte eine Nebenbeobachtung an einem bereits lactierenden Tier, das interessehalber mitinfiziert worden war, den Schlüssel zu weiteren Arbeiten und eigentümlichen Beobachtungen.- Eine vorläufige Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse ist von KRAMPITZ und DIESKO bereits veröffentlicht worden. (77).

II) MATERIAL UND METHODIK

METHODEN DES FORMALEN UND DES KAUSALANALYTISCHEN TEILES

A) Die Versuchstiere

a) Der Mäusestamm

Es wurden ausschließlich Mäuse des Kolonienstammes NMRI (Naval Medical Research Institute, Bethesda, Maryland, USA), Zuchtstamm Tübingen, verwendet.

Sämtliche Versuche wurden mit weiblichen Mäusen (Nulliparae) des Alters von 3 - 4 Monaten und der Gewichtsklasse 33 - 35 g durchgeführt.

b) Trächtige Tiere

Um an bestimmten Stichtagen genügend trächtige bzw. lactierende Tiere in genau gleichem Stadium zur Verfügung zu haben, wurden stets doppelt so viele Zuchtpaare (1:1; pro Paar ein Käfig; Gemeinschaft drei Tage lang) angesetzt als der Versuch erforderte. Dieses Vorgehen gewährleistet genügend synchrone Geburtstermine.

c) Jungtiere

Die Jungenzahl der lactierenden Mäuse wurde ab der Geburt konstant auf 10 gehalten. Gestorbene Junge oder nicht selben während der Krankheit von den Müttern gefressene wurden durch gleichaltrige Jungmäuse gesunder Mütter ersetzt. Diese wurden fast stets umgehend angenommen.

d) Unterbringung der Mäuse

Großer Wert wurde auf die standardisierte Haltung der Tiere gelegt. Trächtige, lactierende und Kontrollmäuse wurden stets einzeln in Macrocolon^{R} - Käfigen (16 x 22 cm) gehalten. Die Einbringung in Einzelkäfige erfolgte so-

gleich nach der dreitägigen Deckzeit.

Raumtemperatur:	22 - 25° C
Relative Luftfeuchtigkeit:	50 - 65%

e) Futter:

Besonders im Hinblick auf Versuch IIIBc seien genauere Angaben über die Art des Futters gemacht. Die Tiere erhielten neben Wasser ad. libid. einheitlich das Versuchstier-Alleinfutter für Mäuse Murilan^{R} .- Zusammensetzung des Futters nach Angabe des Herstellers (Bayerische Kraftfuttergesellschaft m.b.H. , Landshut, Bayern):

30% Speisehaferflocken

30% Eiweißmischung- bestehend aus:
Fischmehl, Sojaschrot extr.- phosphorsaurem Futterkalk- Magermilchpulver- Süßmolkenpulver- Kohlensaurem Futterkalk.

14% Maisschrot

10% Tapiokamehl

6% Melasse

5% Weizenschrot

2% Sojaschrot extrahiert

2% Lucernegrünmehl

1% Weizennachmehl, mit Wirkstoffen angereichert

100%

Wertbestimmende Bestandteile:

Rohprotein	24,3%
Fett	5,4%
Rohfaser	3,0%

Murilan^{R} enthält im Zusatzverfahren: Vitamine der B-Gruppe (außer Vitamin B_{12}), Vitamine A, C, D_3 und E sowie Mineralsalze, Spurenelemente und Methionin. (Keine Antibiotika!)

B) Der Trypanosomenstamm

Den Versuchen diente nur ein einziger Trypanosomenstamm: der WH - Stamm (Wellcome- Brazil- Hamburg). Es handelt sich um einen äußerst virulenten Stamm. Er wurde im Jahre 1926 aus einem brasilianischen Patienten isoliert, von 1926 - 1936 von REICHENOW am Hamburger Tropeninstitut gehalten, seit 1936 von HOARE in den Wellcome Laboratorien in London. 1937 gelangte er zu den Farbenfabriken Bayer A.G., die uns im August 1964 freundlicherweise damit infizierte Mäuse überließen. Der Stamm wurde sowohl in den Bayerwerken (40) als auch im Münchner Tropeninstitut ausschließlich durch Blutpassagen von Maus zu Maus übertragen.- Das Verhalten des Stammes in der Maus wurde insbesondere von HUSCHKA (45,46) und neuerdings auch von PHILLIPS (126) charakterisiert.- Im übrigen erfolgte auch die von MELZER und KOLLERT (110) im Jahre 1963 beschriebene menschliche Laboratoriumsinfektion mit dem WH - Stamm.

C) Blutentnahme und -übertragung

a) Blutentnahme zur Passage:

Nach der von HALPERN und PACAUD (42) angegebenen Methode wurde das infektiöse Blut mit Hilfe von Glaskapillaren aus dem venösen Plexus retroorbicularis der Maus unter Heparin- (Vetren^{R}) - Zusatz entnommen. Derart sind aus einer Maus der verwendeten Gewichtsklas-

se 1,5 - 2 ml Blut zu gewinnen. Die zur Erreichung einer bestimmten Parasitenzahl pro Volumeneinheit nötige Verdünnung wurde mit physiologischer NaCl-Lösung von Körpertemperatur durchgeführt. Es folgte umgehend Überimpfung auf die Versuchstiere (i.m.; Schenkel).

b) Berechnung einer beliebigen Trypanosomenzahl für ein beliebiges Inokulationsvolumen nach dem Prinzip des "inversen Dreisatzes"

Im folgenden soll an Hand eines Beispiels eine Formel abgeleitet werden, die ich entwickelte, um beliebig viele Trypanosomen in einem beliebigen Suspensionsvolumen übertragen zu können. Meist wird es nämlich das Ziel sein, eine gewünschte Anzahl Parasiten aus dem Blut in einem konstanten Inokulationsvolumen zu suspendieren und zu verimpfen.

In den beschriebenen Versuchen wurde beispielsweise ausschließlich das Volumen 0,25 ml gebraucht und intramuskulär (Oberschenkel) übertragen.- Als praktisches Rechenbeispiel diene die Aufgabe wie sie im Versuch g (Teil III A) gestellt war: eine Verdünnungs-"Reihe"

Gegeben: 5 Mäuse-Gruppen zu je 7 Tieren; $\Sigma = 35$.

Aufgabe: Jedes dieser Tiere soll eine definierte Trypanosomenzahl in einem definierten, hier in allen Gruppen gleichen Inokulationsvolumen (=0,25 ml) erhalten.

Gruppe	Tryp.Zahl $\cdot 10^6$/Tier	Tryp.Zahl $\cdot 10^6$/ 7 Tiere
I	1,00	7,00
II	0,70	4,90
III	0,40	2,80
IV	0,10	0,70
V	0,05	0,35
		$\Sigma_{35} = 15,75$

TAB. 1:

Zahlenbeispiele für 5 gestufte Dosen wie sie etwa in Versuch III Ag angewandt wurden.

Eignung des Rechenverfahrens

1) Zur exakten Berechnung einer beliebigen Trypanosomenzahl in einem beliebigen Inokulationsvolumen.
2) Zur Trypanosomenübertragung von hochparasitämischen Tieren. - Die Entnahme kleinster Blutvolumina ist mit unnötigen Ungenauigkeiten verbunden.

Arbeits- und Rechenvorraussetzung

Die dem gewünschten Inokulationsvolumen V_I gleiche Blutmenge V_B (im Beispiel $V_I = V_B = 0,25$ ml) muß mehr Trypanosomen enthalten als für die die meisten Trypanosomen erfordernde Gruppe (im Beispiel Gruppe I : $7 \cdot 10^6$ Tryp.) nötig sind:

$$Z_{TB} \ (\geq) \ n \cdot Z_{TI} \ ;$$

$$(V_B) \qquad (V_I) \ ; \ (V_B = V_I)$$

D.h.: es sind also möglichst hochparasitämische Tiere erforderlich; Tiere des Finalstadiums.

Durchführung (Beispiel):

2 hochparasitämische Übertragungstiere lieferten zusammen 2 ml Blut mit insgesamt $76{,}80 \cdot 10^6$ Trypanosomen. (Natürlich kann man auch mehr Blut als 2 ml entnehmen. Mit der Mindest- Ausgangsmenge von 2 ml läßt sich aber gut rechnen) .

In 0,25 ml dieser Blutmenge (2ml) befindet sich der achte Teil der Trypanosomen:

$$\frac{76{,}80}{8} = 9{,}60;$$

0,25 ml Blut enthalten demnach $9{,}6 \cdot 10^6$ Trypanosomen. Zur Herstellung der Verdünnungs "reihe" wird das Blut - jeweils 0,25 ml - in 5 Gefäße (5 Gruppen!) einpipettiert.

Zur Verdünnung mit Kochsalzlösung folgt fünfmal das folgende Berechnungsschema (am Beispiel der Gruppe I: $1 \cdot 10^6$ Tryp./ Tier) :

Inverser Dreisatz:

$9{,}6 \cdot 10^6$ Tryp./0,25 ml sind in 0,25 ml enthalten

$1{,}0 \cdot 10^6$ Tryp./0,25 ml " " x ml "

$$x = \frac{0{,}25 \cdot 2{,}6}{1{,}0} = 2{,}40 \text{ [ml]}$$

Die Gesamt flüssigkeitsmenge - bei gleichmäßiger Mischung pro 0,25 ml $1{,}0 \cdot 10^6$ Trypanosomen enthaltend - beträgt 2,40 ml. (Erforderlich sind für 7 Tiere nur $7 \cdot 0{,}25$ ml = 1,75 ml.)

Von der Gesamtflüssigkeitsmenge werden die 0,25 ml Blut wieder subtrahiert:

2,40 - 0,25 = 2,15 ml NaCl - Lösung

Also:

0,25 ml Blut + 2,15 ml NaCl - Lösung = 2,40 ml. - Nach diesem Schema werden auch die anderen gewünschten Parasitenzahlen pro Tier und Vol. - Einheit (0,25 ml) berechnet (am Beispiel der nächsten beiden Dosis - Stufen):

Gruppe	Gewünschte Tryp.-Dosis.10^6/Tier	Jeweilige Zugabe von ml NaCl-Lösung zu (0,25) ml Blut
I	1,0	2,15
II	0,7	3,18
III	0,4	5,75

TAB. 2: Am Beispiel von 3 Dosen berechnete nötige Verdünnungsflüssigkeitsmenge.

Demnach läßt sich eine Parasitensuspension S ≙ x [ml] mit einer gewünschten Trypanosomenzahl Z_{TI} pro Inokulum und gewünschtem Inokulationsvolumen V_I zweckmäßigerweise nach der folgenden Formel berechnen:

$$S = \frac{V_I \cdot Z_{TB}}{Z_{TI}} \quad ;$$

$$S = \underbrace{V_B}_{\text{Blut [ml]}} + \underbrace{\frac{V_I \cdot Z_{TB}}{Z_{TI}} - V_B}_{\text{NaCl - Lösung [ml]}} \quad [ml]$$

Dabei muß gelten:

$$Z_{TB} \quad (\geq) \quad n \cdot Z_{TI} \quad ;$$

$$(V_B) \qquad\qquad (V_I); \quad (V_B = V_I)$$

Die zur Verdünnung des parasitenhaltigen Blutes erforderliche Kochsalz-Lösungs-Menge V_{NaCl} errechnet sich somit unter Berücksichtigung der oben genannten Forderung nach der Beziehung:

$$\boxed{V_{NaCl} = \frac{V_I \cdot Z_{TB}}{Z_{TI}} - V_B \ [ml]}$$

Zusammenfassende Erklärung der Abkürzungen:

S (= x) : Gesamte Parasitensuspension [ml] nach Verdünnung des Blutes mit NaCl-Lösung

V_B (= V_I) : = V_{Blut}: dem gewünschten Inokulationsvolumen (V_I) gleichbes Übertragungsblutvolumen [ml] .

V_I (= V_B) : = $V_{Inokulum}$: gewünschtes Inokulationsvolumen pro Tier [ml] .

Z_{TB} : Trypanosomenzahl in V_B

Z_{TI} : Gewünschte Trypanosomenzahl im einzelnen Inokulum (V_I) .

n : Anzahl der Tiere der Gruppe (im Falle einer Verdünnungs "reihe" derjenigen Tiergruppe, für die die meisten Trypanosomen erforderlich sind) .

Als Parasitendosis pro Maus

(in 0,25 ml Flüssigkeit) wurde in der Mehrzahl der Versuche $1{,}3 \cdot 10^6$ gewählt. Anlaß zur Entscheidung für diese Dosis gaben informierende Vorversuche sowie eine persönliche Mitteilung von Herrn Dr. HABERMEHL (39), Farbenfabriken Bayer A.G. (von denen uns der Trypanosomenstamm überlassen wurde). Danach führen injizierte Trypanosomenmengen (...) von $1 \cdot 10^6$ bis ca. $5 \cdot 10^6$ /Maus etwa binnen 9-12 Tagen zum Tode von Versuchsmäusen.

Bei Verabreichung der Dosis $1{,}3 \cdot 10^6$ Organismen / Maus waren nie vor dem 3. Tage nach der Infektion Trypanosomen im peripheren Blut ("Dicker Tropfen") erkennbar. Die Zählung begann am vierten Tage p.i.

c) Blutentnahme zur Parasitenzählung

Zur Zählung der Parasiten im verdünnten venösen Blut mit Hilfe des Phasenkontrastmikroskopes wurde den Mäusen das Blut aus der Schwanzvene entnommen (Kappen eines winzigen Schwanzstückchens; Verwerfung des ersten Tropfens). Das Schwanzblut wird auf einen Objektträger gedrückt, um anschließend mit einer Blutsaugepipette nach HAEBORN (0,01 ml) aufgenommen zu werden. In Fällen täglicher Trypanosomenzählung wurde streng auf den 24-Stunden-Rhythmus der Blutentnahme geachtet.

d) Technik des "Dicken Tropfens"

Diese allgemein geübte Anreicherungsmethode (Färbung nach GIEMSA) ist besonders gut zur Auffindung von Blutparasiten bei spärlichem Befall geeignet. Die Methode zeigt den Beginn des Auftretens der Blutform des Trypanosoms an, um so gegebenenfalls tägliche Trypanosomenzählung einzuleiten.

e) Xenodiagnose

Das ist eine besonders empfindliche biologische Anreicherungsmethode in den übertragenden Raubwanzen (BRUMPT, 16). Es werden mit Sicherheit nicht infi-

zierte, aus dem Ei gezogene Raubwanzen verwendet. Bei Verdacht auf Chagaskrankheit, die sich aber sonst nicht nachweisen läßt, werden sie an Menschen oder Tieren angesetzt. Nach über vierzehn Tagen kann man im positiven Falle im Enddarm der Insekten Trypanosomen nachweisen.- Für die im kausalanalytischen Teil, Vers. c) geschilderte Xenodiagnose diente die Art Rhodnius prolixus.

B) Fixierung und Verdünnung des Blutes

Für die Zählung der Parasiten unter dem Phasenkontrastmikroskop ist Fixierung des Blutes sowie - entsprechend der Parasitendichte - Verdünnung mit physiologischer NaCl-Lösung (p_H 7,0) nötig. Als Fixierungsflüssigkeit diente eine von MÖHLPFORDT (115) zur Zählung von Blutflagellaten angegebene Mischung folgender Zusammensetzung: 75 ml Äthanol (80%), 7 ml Formol (40%), 18 ml Eisessig und 0,025 g Phenol. Mit der Verdünnungsstufe 1:256 ließen sich - so erforderlich - die größten vorkommenden Parasitenmengen (also kurz vor dem Sterbetag der Mäuse) mühelos zählen.

Verdünnungsstufen (V)

1,)1:33 0,01 cm^3 Blut
0,17 " NaCl-Lösung (0,85%)
0,15 " Fixierungsflüssigkeit

2,)1:64 0,01 cm^3 Blut
0,33 " NaCl-Lösung (0,85%)
0,15 " Fixierungsflüssigkeit

3,)1:128 0,01 cm^3 Blut
0,67 " NaCl-Lösung (0,85%)
0,60 " Fixierungsflüssigkeit

4,)1:256 0,01 cm^3 Blut
1,35 " NaCl-Lösung (0,85%)
1,20 " Fixierungsflüssigkeit

E) Zählung der Parasiten

a) Mikroskop

Die Zählung der Trypanosomen erfolgte mit Hilfe des Phasenkontrastmikroskopes (Vergrößerung : 400-fach) und der Thoma-Kammer. Pro Maus wurde eine Kammer-und zwar das gesamte Blickfeld ausgezählt.- Die Trypanosomenzahl pro mm^3 Blut (T_{BL}) errechnet sich aus dem Produkt der in der gesamten Thomakammer gezählten Trypanosomenzahl (T_K) und der verwendeten Verdünnungsstufe (V) mal Kammer-Index (10). Also:

$$T_{BL} = T_K \cdot V \cdot 10$$

b) Gleichmäßig - wechselnde Zählweise

Lag eine Versuchseinheit mit d n Tierblöcken A,B,C... (mit den Mäusezahlen $n_A = n_B = n_C$....) und den Einzeltieren a_1,.....,a_n; b_1,.....,b_n; c_1,.....,c_n vor, so hatte das Zählschema für die Protozoen grundsätzlich das Aussehen a_1, b_1, c_1, ...; a_2, b_2, c_2...; .....; a_n, b_n, c_n.. Korrekterweise wurden die Mäuse auch nach dem angegebenen Muster infiziert. - Bei der Infektionsdosis $1{,}3 \cdot 10^6$ Tryp./Maus, der höchsten und bei den meisten der Versuche verwendeten, wurde mit der Zählung der Organismen stets am 4. Tage p.i. begonnen. Zählversuche vorher sind sinnlos, zumal bei noch geringerer Verdünnung als 1:33 die Aufhellung des Blutes zu gering wäre.

Die Einzelzählwerte der Parasiten wurden im folgenden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht angegeben, sondern nur die Tagesmittelwerte $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$.

F) Mathematisch - statistische Methoden

a) Versuchsplanung

Bei den Experimenten wurden nach Möglichkeit die von LINDER (87) aufgestellten vier Grundsätze statistischer Versuchsplanung berücksichtigt:

1) Wiederholung, 2) zufällige Zuordnung, 3) Blockbildung, 4) Versuchssymmetrie.

Zumindest alle Fundamentalversuche sind durch Wieder-

holung überprüft worden. Bei einigen nicht reproduzierten Versuchen wurde die Irrtumswahrscheinlichkeit durch eine größere Individuenzahl verringert. Alle Blockzuteilungen erfolgten mit Hilfe zufällig angeordneter Zahlen. Versuchssymmetrie fand stets Anwendung. Wegen des allmählichen Überganges der Verteilung der Student-Variablen t in die Normalverteilung wurden wenigstens 7 Tiere pro Versuchsblock herangezogen, in der Regel aber mindestens 10 (ohne Wiederholung). Hier decken sich ja die Funktionsbilder schon fast vollständig.

b) Parasitämiekurven

Die einzelnen Kurvenpunkte sind bestimmt durch das arithmetische Mittel der Parasitenzahlen/mm^3 Blut zum jeweiligen Zeitpunkt und deren mittlere Fehler: $\bar{x} + s_{\bar{x}}$. Als Kurvenendpunkt wurde der Schnitt mit der prämortalen Trypanosomenmenge der betreffenden Versuchsgruppe angesehen.

c) Quantitative Auswertung

Benutzt wurden insbesondere die Bücher der mathematischen Statistik von WEBER (149) und SPIEGEL (144) sowie ein Abriß von KOLLER (69).
Am häufigsten angewendet wurden die Formeln für die Standardabweichung (s):

$$s = \pm \sqrt{\frac{\Sigma (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} = \pm \sqrt{\frac{s_{xx}}{n - 1}} \qquad (I)$$

wobei sich s_{xx} vereinfacht nach der Beziehung

$s_{xx} = \sum x_i^2 - n \cdot \bar{x}^2$ berechnet. Der mittlere Fehler des Mittelwertes ($s_{\bar{x}}$) wurde nach der Formel

$$s_{\bar{x}} = \pm \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n \cdot (n-1)}} = \pm \frac{s}{\sqrt{n}} \qquad \text{(II)}$$

bestimmt.

Bei ungleichem Probenumfang ($n_1 \neq n_2$) wurde zur Bestimmung der Student - Variablen t (t-Test) anstatt der Formel für gleichgroßen Stichprobenumfang ($n_1 = n_2$)

$$t_f = (\bar{x} - \bar{y}) \cdot \sqrt{\frac{n \cdot (n-1)}{\sum (x_i - \bar{x})^2 + \sum (y_i - \bar{y})^2}} \qquad \text{(III)}$$

lieber

$$t_f = (\bar{x} - \bar{y}) \cdot \sqrt{\frac{n_1 \cdot n_2 \cdot (n_1 + n_2 - 2)}{(n_1 + n_2) \cdot \left[\sum (x_i - \bar{x})^2 + \sum (y_i - \bar{y})^2 \right]}} \qquad \text{(IV)}$$

herangezogen. Die Berechtigung dieser Formel ist leicht einsehbar , wenn man in IV) $n_1 = n_2$ setzt. Dies zeigt den Übergang in III). - f bedeutet die Anzahl der Freiheitsgrade.

Die Streuungsbreite (Extremspanne, Variationsbreite)

wurde nach

$$R = X_{max.} - X_{min.} \qquad (V)$$

errechnet. Die Prüfung der Wahrscheinlichkeit p erfolgte zur Kontrolle mit Hilfe der Tafeln von [illegible] (124).

d) Ausreißerproblem

Als Grundsatz diente der von KOLLER (69) angeführte: Berechnung von S ohne den "Ausreißer", Verwerfung bei Abweichung vom Mittelwert von mindestens 4S . - Überlebende (lactierende) Mäuse wurden grundsätzlich einer anderen Bevölkerung zugerechnet, letztlich also als "Ausreißer" behandelt.

METHODEN DES KAUSALANALYTISCHEN TEILES:

a) Zur Frage einer immunbiologischen Ursache

Versuchsvorlage war die von CUNNINGHAM und VAN HOOVE (22) für afrikanische Trypanosomen entwickelte serologische Neutralisationsreaktion. In dem von mir durchgeführten Experiment (Nr. a) wurde auf den Versuch, einen Titer zu ermitteln, verzichtet. Arbeitsziel war nur die Gewinnung eines qualitativen Ergebnisses. Die Versuchsanordnung ist entsprechend abgewandelt worden.

b) Hormonversuch mit Prolactin

Um den möglichen Einfluß eines hormonalen Faktors

zu prüfen, ist ein Versuch mit dem Leithormon der Lactation Prolactin angesetzt (Nr. b) worden. Es handelte sich um ein ovines Prolactinpräparat der Arzneimittel GmbH HEHRING (Lüsseldorf- Kaiserswerth).

c) Nutritive Einflüsse

Das angegebene "Futter A" wurde für den Versuch IIIBc (Kausalanalytischer Teil) entwickelt. Während sich das bereits beschriebene Standardfutter (= Murilan® ="Futter B") vor allem durch einen hohen Kohlehydratanteil auszeichnet, wie er ja auch der natürlichen Ernährung der Mäuse entspricht, sollte sich das selbst gefertigte (Futter A) in erster Linie durch einen erheblich höheren Eiweißgehalt von ihm unterscheiden. Der große Prozentsatz Trockenfleisch war u. a. zur ausreichenden Eisen- und Phosphatversorgung der Mäuse gedacht. (vgl. hierzu KON und COWIE, 74) . - Zur Deckung des Bedarfes an Polyensäuren eignen sich vorzüglich Sonnenblumenkerne. Linol- und Linolensäure, wie sie überreichlich in diesen Samen vorkommen (Linolsäure 30,7 % im eßbaren Anteil der käuflichen Ware; 11), sind als das "Vitamin F" von Ratte und Maus erkannt (zusammenfassende Darstellung bei KON und COWIE, 74; MORRIS, 114) .
Die Zusammensetzung des Futters (= Pulvergemisch vor dem Backen) sowie den Inhalt an Protein und Fett zeigt die folgende Tabelle:

[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	INFORMATION+
Trockenrind-fleisch-Mehl (ungesalzen, ohne Fremd-stoffe)	30,0	18,0	7,0	86
Sojamehl (vollfett)	20,0	8,0	4,0	35
Trockenmilch (aus Voll-milch)	20,0	5,2	5,0	"
Weizenkleie	10,0	7,2	0,2	"
Eieralbumin (pulvert)	7,5	7,0	0,1	112
Casein(ge-pulvert)	7,5	6,6	0,1	10
Sonnenblumen-kerne (ohne Schale; ge-pulvert)	5,0	0,7	1,0	11
Σ %	100,0	46,9	17,4	

TAB.3

Zusammensetzung der entwickelten Futterart A.

Der Protein- Fett- Anteil ist auf 100g eßbaren Trocken-anteils des Gesamtgemisches bezogen.

Das bedeutet also auf Murilan^{R} bezogen nahezu eine Verdoppelung des Proteinanteiles sowie etwa eine Ver-dreifachung des Fettgehaltes.

+) d.h. Nummer im Literaturverzeichnis

Das Gesamtgemisch wurde mit Wasser versetzt und der Teig 40 min bei 175°C gebacken. Bestreichen des Backbleches mit etwas Cocosfett.- Nach dem Backen war das Gewicht (H_2O) um ca. 8% angestiegen.[x] Das Futter wurde täglich durch frisches ersetzt.- Es ist darauf zu achten, daß das Futter nicht zu stark trocknet und somit härtet.- Zusätzlich erhielten die mit Futter A" ernährten Mäuse täglich 0,4 g Kopfsalat.
Die Mäuse nahmen dieses angenehm käseartig riechende Futter ausgesprochen gerne und zogen es - wie die Vorversuche ergaben- dem Standardfutter auch über längere Zeit hin vor. Letzteres beachteten sie so gut wie nicht mehr.

d) Differentialblutbilder verschiedener Mäusegruppen

In den nach DIEMSA gefärbten Blutausstrichen wurden je 200 weiße Blutzellen differenziert.

x) Der Wasserzusatz zur Trockenmasse (Teig) wurde nicht festgehalten.

III.) ERGEBNISSE

A) Versuche formaler Art

a) Vergleich trächtiger Mäuse mit Normaltieren

α) Fragestellung:

Als Bezugsmodelle für dieses Experiment dienten die in der Einleitung (Teil B) dargelegten Versuche von KRAMPITZ. Angewandt auf das Verhalten von T. cruzi werden Parasitämie und Absterbezeit trächtiger Mäuse und weiblicher Kontrollmäuse miteinander verglichen.

β) Versuchsanordnung:

Es wurden zwei Versuche gleicher Versuchsanordnung durchgeführt. Die statistische Analyse der Zahlenwerte der korrespondierenden Gruppen beider Versuche zeigte hinsichtlich Parasitämie und Absterberate keinen signifikanten Unterschied ($p > 0{,}05$). Der Versuch wird deshalb als ein einheitlicher dargestellt.
Zur Erlangung eines einheitlichen Decktermines und davon abhängig eines einheitlichen Geburtstermines (24 h) wurden die Mäuse nur 24h mit den Männchen zusammengelassen. Infektionstag der trächtigen Tiere : 13 . Graviditätstag - also noch in der sensiblen Phase der Gravidität bei T. duttoni- Infektion nach KRAMPITZ.- Parasitendosis: $1{,}3 \cdot 10^6$ Tryp./Maus .- Zahl der trächtigen

Tiere: $n_1 = 20$. — Zahl der Kontrolltiere : $n_2 = 20$.

Die Abbildung zeigt schematisch die Versuchsanordnung:

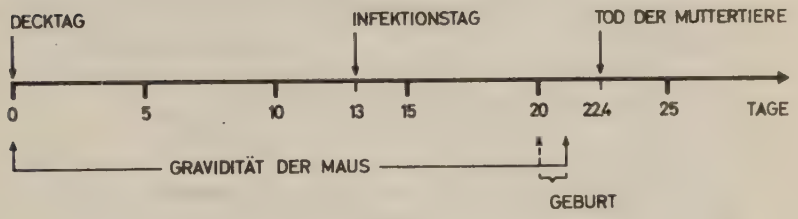


Abb. 2

Schematische Darstellung der Anordnung von Versuch III Aa.

7) Ergebnis:

1.) Verlauf der Parasitämie:

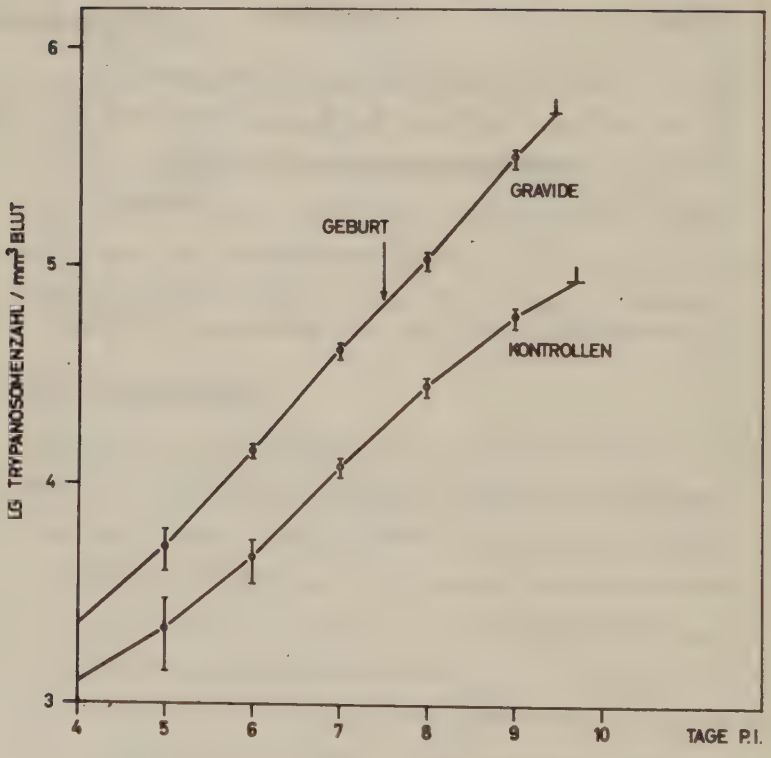


ABB.3

Parasitämiekurven trächtiger und normaler Mäuse.

Abbildung 3 zeigt deutlich den unterschiedlichen Verlauf der Tages-Parasitenzahlen - abgesichert durch Auftragung der mittleren Fehler der Mittelwerte - der beiden Tiergruppen. Die Kurve der trächtigen Tiere

verläuft weit steiler und erreicht auch ein höheres Endniveau der Parasitendichte im Blut, - Als Geburtstermin wurde für Abb. 3 der 20,5. Tag gewählt.- Vier Tiere gebaren tote Junge, fünf hatten mehrere Totgeburten innerhalb des Wurfes.

2.) Lebenstage p.i.:

Tier Nr.	LEBENSTAGE P.I.	
	Trächtige x_i	Kontrollen y_i
1	8	10
2	10	10
3	10	9
4	9	10
5	10	9
6	10	11
7	10	10
8	10	9
9	9	9
10	10	10
11	9	9
12	9	10
13	9	11
14	8	8
15	10	11
16	10	10
17	10	10
18	11	9
19	8	9
20	9	10
n=20	$\bar{x}$ =9,45	$\bar{y}$ =9,70
	s =0,83	s =0,80
	$s_{\bar{x}}$ =0,18	$s_{\bar{y}}$ =0,18

TAB. 3: Lebenstage p.i. trächtiger und normaler weiblicher Mäuse.

$t_f = 0,95$; $(f = 38)$; $p > 0,05$

Die trächtigen Mäuse leben also nicht kürzer als Normalmäuse, was bei der stark erhöhten Parasitämie der trächtigen Tiere sonderbar anmutet. Die Nullhypothese bezüglich der Lebenstage nach der Infektion trifft zu.

b) Vergleich lactierender, unmittelbar nach der Geburt infizierter Mäuse mit Normaltieren.

α) Fragestellung:

Wie bereits in der Einleitung bemerkt, fiel eine bei Versuch a) mitinfizierte lactierende Maus durch eine übermäßig lange Lebenszeit nach der Infektion auf. Das eigentümliche Verhalten des Tieres gab Anlaß zu systematischen Versuchen.- Es werden unmittelbar nach der Geburt (d.h. binnen 24 h) mit T. cruzi infizierte lactierende Mäuse mit entsprechenden Kontrolltieren bezüglich Parasitämie und Lebenszeit nach der Infektion mit gleichen Parasitendosen verglichen. (Die Lactation von LMRI - Mäusen dauert 3 Wochen).

β) Versuchsanordnung:

Wiederum wurde nach dem ersten Versuch ein Kontrollversuch gleichen Stichprobenumfanges angesetzt. Wieder erwiesen sich die korrespondierenden Tiergruppen als statistisch homogene Masse. Die beiden Versuche werden also wieder einheitlich dargestellt.- Den lactierenden Mäusen wurden gleichalte und gleichschwere normale Kontrolltiere gegenübergestellt.

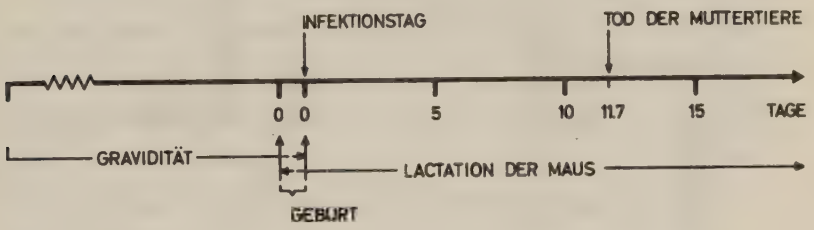
Jungenzahl / Tier = const.= 10.

Zahl der Lactierenden : n_1 = 20

Zahl der Kontrolltiere : n_2 = 20

Parasitendosis : $1{,}5 \cdot 10^6$ Tryp. / Maus.

Schematisch läßt sich die Versuchsanordnung wie folgt darstellen:



Schematische Darstellung der Anordnung von Versuch III Ab.

7) Ergebnis

1.) Verlauf der Parasitämie

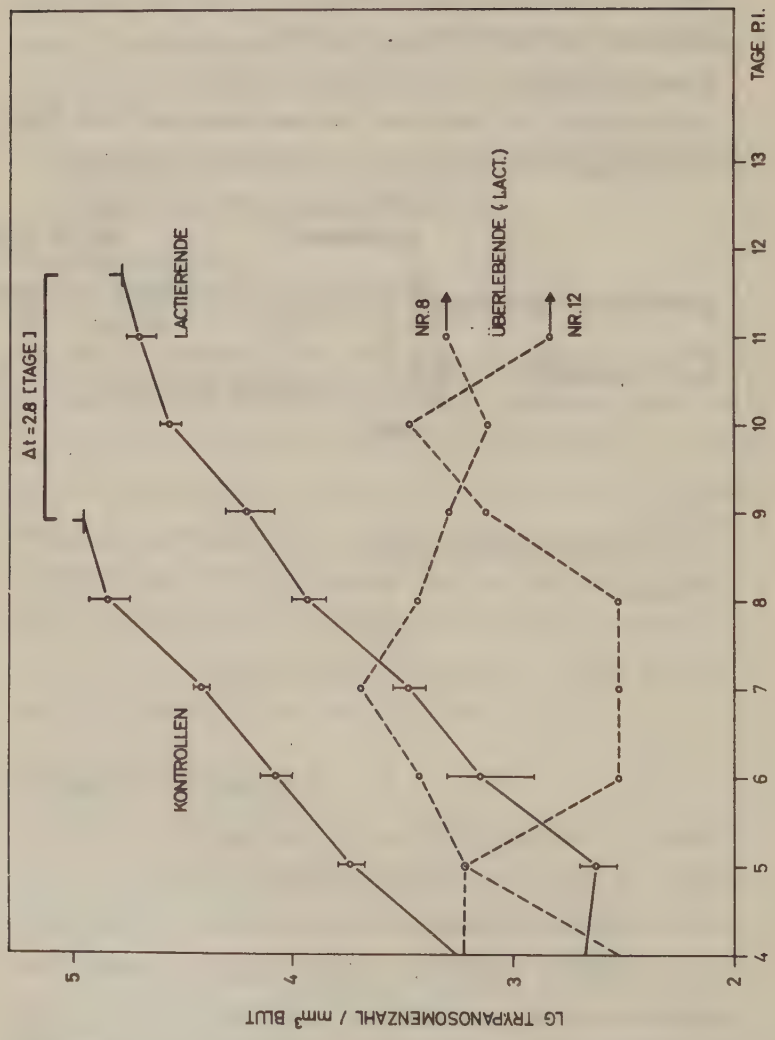


ABB. 5

Parasitämiekurven von lactierenden(Infektion unmittelbar nach der Geburt) Mäusen und Normaltieren. Der Parasitämie-

verlauf der überlebenden lactierenden Mäuse ist gesondert dargestellt.

Wie die Abb. 5 deutlich zeigt, liegt die Parasiten-Kurve der Normaltiere - abgesichert gegen die der lactierenden Mäuse durch die graphisch eingetragenen mittleren Fehler der Mittelwerte der Tages- Parasitenmengen- wesentlich höher. Und zwar im Durchschnitt nahezu zehnmal so hoch. Die Parasitenkurven der beiden überlebenden lactierenden Mäuse, die einer anderen statistischen Bevölkerung zugerechnet werden, sind gesondert eingezeichnet. Bei Tier Nr. 8 waren am 19. und bei Tier Nr. 12 am 27. Tag auch im "Dicken Tropfen" keine Trypanosomen mehr nachweisbar.

2.) Lebenstage p.i.

Tier Nr.	LEBENSTAGE P.I.	
	Lactierende x_i	Kontrollen y_i
1	11	10
2	12	9
3	10	10
4	12	9
5	11	9
6	11	9
7	12	6
8	überl.	9
9	13	10
10	11	10
11	11	9
12	überl.	8
13	12	9
14	13	7
15	12	9
16	12	11
17	11	9
18	12	9
19	13	8
20	12	9
n=20	$\bar{x}$ =11,72	$\bar{y}$ =8,95
	s = 0,83	s =1,09
	$s_{\bar{x}}$ = 0,19	$s_{\bar{y}}$ =0,24

TAB. 4

Lebenstage p.i. von lactierenden Mäusen (Infektion unmittelbar nach der Geburt) und Kontrolltieren.

Die Berechnung von t_f (f = 36) erfolgte nach der Formel für $n_1 \neq n_2$ (Formel IV), da zwei lactierende Mäuse überlebten, die als einer anderen Bevöl-

kerung entstammend betrachtet wurden.

$$t_f = 8{,}61; \quad p < 0{,}001.$$

Lebenszeit der lactierenden Mäuse nach der Infektion: 11,7±0,19 Tage (Kontrolltiere: 8,9 ± 0,24 Tage).- Die Lactierenden überlebten also die Kontrollen im Mittel um 2,8 Tage. Das ist im Vergleich zur Lebenszeit der Normalmäuse nach der Infektion immerhin etwa ein Drittel länger. Zwei Tiere - ein Zehntel - überlebten die Infektion ganz (Beobachtungszeit der beiden Tiere - wie in allen anderen Überlebensfällen auch - ein viertel Jahr). - Die Differenz der Lebenszeit nach der Infektion (Δ t) von lactierenden und Kontrollmäusen ist mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0{,}001$ sehr gut gesichert. Eine Nullhypothese - d.h. die Annahme, daß die Tiere bezüglich ihrer Sterbetage in Wahrheit dem selben Kollektiv entstammen - muß mit einer Wahrscheinlichkeit von $p < 0{,}001$ verworfen werden. Eine Differenz zwischen den beiden Stichproben - Mittelwerten wird nur in weniger als 1‰ der Fälle nicht auftreten.

c) Vergleich lactierender, am 10. Tage nach der Geburt infizierter Mäuse mit lactierenden, unmittelbar nach der Geburt infizierten Tieren

α) Fragestellung:

Die Ursache des Befundes von Versuch b) ist unbekannt.

Wenn die Ursache ein der Lactation eigentümlicher Faktor ist, so wäre es denkbar, daß die größere Saugintensität älterer Jungen sowie andere Veränderungen im Laufe der anhaltenden Lactation die Parasitämie von T. cruzi merklich deprimierend beeinflussen. Andererseits soll eine Veränderung im unmittelbaren Bereich der Geburt ausgeschlossen werden.

β) Versuchsanordnung:

Es werden lactierende, unmittelbar nach der Geburt mit T. cruzi infizierte Mäuse (Gruppe I) mit lactierenden, am 10. Tage nach der Geburt infizierten Mäusen (Gruppe II) bezüglich Parasitämie und Lebenszeit nach der Infektion miteinander verglichen. Es handelte sich um einen Parallelversuch zu Versuch b) , d.h. als Kontrolltiere dienten die Lactierenden bzw. Kontrollen dieses Versuches. Die drei Gruppen wurden gleichzeitig infiziert. Der Wiederholungsversuch -$p > 0{,}05$ ist wieder in der Darstellung beinhaltet.

- Saugmauszahl = const. = 10 -

Zahl der Lactierenden, nach der Geburt infiziert: $n_1 = 20$; Zahl der Lactierenden, am 10. Lactationstage infiziert: $n_2 = 20$. - Parasitendosis: $1{,}3 \cdot 10^6$ Tryp./ Maus.-

Schematisch:

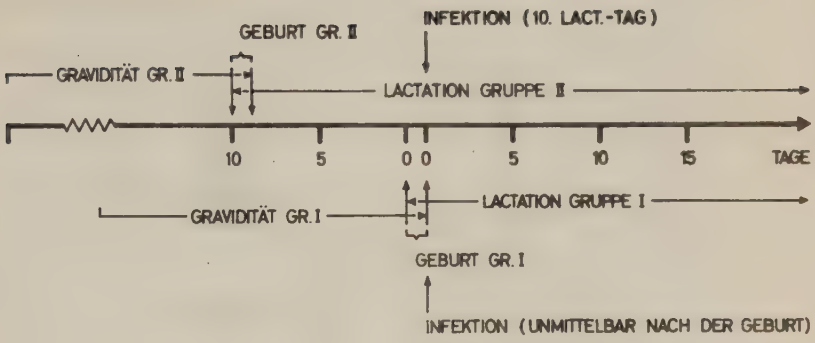


Abb. 6

Schematische Darstellung der Anordnung von Versuch IIIAc.

Ergebnis:

1.) Verlauf der Parasitämie:

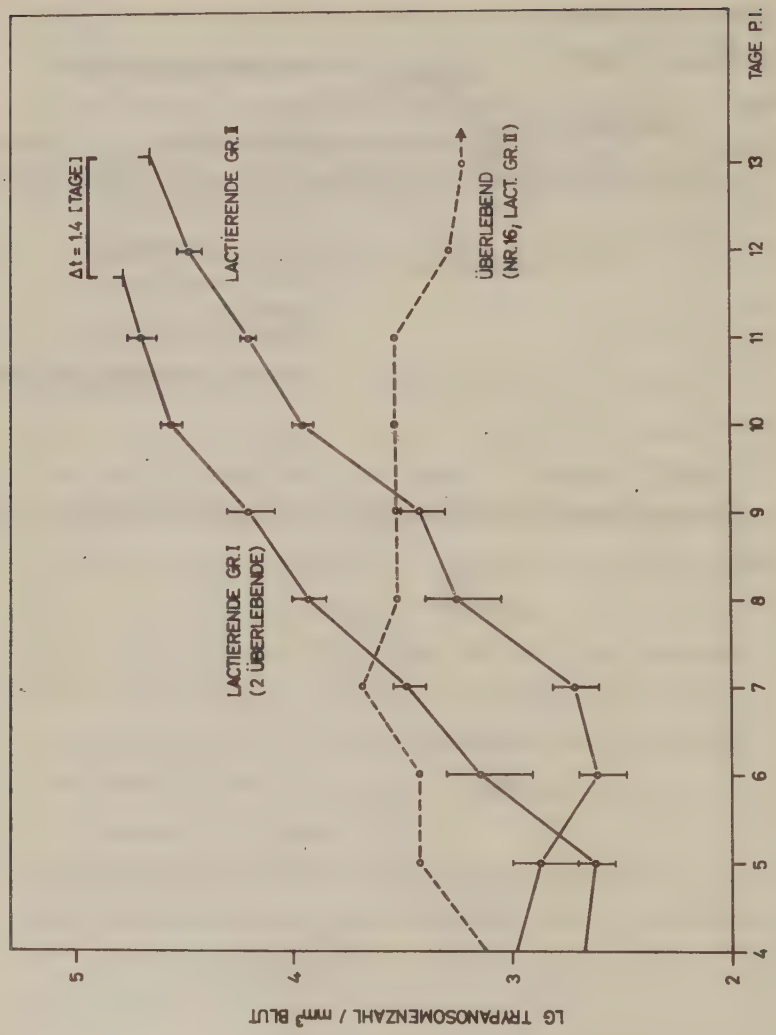


ABB. 7: Parasitämiekurven von unmittelbar nach der Geburt und am 10. Lact.-Tag infizierten Mäusen.

Es liegen also die Parasitenwerte der am 10. Lactationstag infizierten durchschnittlich 3 - 5 mal tiefer als die

der nach der Geburt infizierten Muttermäuse. Wieder ist der Parasitämieverlauf des überlebenden Tieres gesondert dargestellt. Der Übersicht halber werden auch die Parasitenkurven der Tiere 8 und 12 (Vers.b) der Gruppe I weggelassen.

2.) Lebenstage p.i.

Tier Nr.	LEBENSTAGE P.I.	
	Lactierende Gr.I Inf.nach der Geb.	Lactierende Gr.II Inf.10. Lact.-Tag
1	11	13
2	12	15
3	10	11
4	12	15
5	11	12
6	11	10
7	12	15
8	überlebt	12
9	13	13
10	11	14
11	11	13
12	überlebt	15
13	12	12
14	13	11
15	12	13
16	12	überlebt
17	11	14
18	12	12
19	13	13
20	12	15
n = 20	$\bar{x}$ = 11,72	$\bar{y}$ = 13,1
	s = 0,83	s = 1,55
	$s_{\bar{x}}$ = 0,19	$s_{\bar{y}}$ = 0,35

TAB.5

Lebenstage p.i. von unmittelbar nach der Geburt und am 10.Lact.-Tag infizierten Mäusen.

Die Berechnung von t_f (f = 35) wurde wiederum - da $n_1 \neq n_2$ - nach Formel IV durchgeführt.

$$t_f = 3{,}402; \quad p < 0{,}01.$$

Also: Lebenszeit der am 10. Lactationstag infizierten Mäuse (Gruppe II) : 13,1 ± 0,35 Tage. Unmittelbar nach der Geburt infizierte Tiere (Gruppe I) : 11,7 ± 0,19 Tage. Die Mäuse der Gruppe II überlebten demnach die der Gruppe I im Mittel um 1,4 Tage. Allerdings überlebte in Gruppe II nur ein Tier, was aber durchaus innerhalb der Wahrscheinlichkeit liegt. Beobachtungszeit des überlebenden Tieres: 3 Monate.- Die Differenz der mittleren Lebenszeit nach der Infektion (Δt) der beiden Gruppen ist mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0{,}01$ gut gesichert. Eine Nullhypothese muß also mit einer Wahrscheinlichkeit von $p < 1\%$ verworfen werden.

d) Einfluß der Entfernung der Jungen von der Mutter unmittelbar nach der Geburt und unmittelbar vor der Infektion auf den Krankheitsverlauf

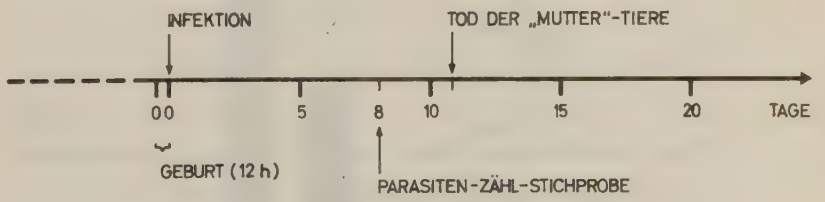
α) Fragestellung:

Der Versuch sollte der Klärung der Rolle der Jungtiere im Krankheitsverlauf säugender bzw. säugefähiger Mäuse dienen. Deshalb wurden die Jungen unmittelbar nach der Geburt und kurz vor der Infektion von den Muttertieren entfernt. Es wird dadurch eine

weitere Antwort auf die Frage nach dem Einfluß des Saugreizes auf den Gang der Krankheit erwartet.

β) Versuchsanordnung

Hier erfolgte die Entfernung der Jungen und die Infektion im Zeitraum von 12 h nach der Geburt. Aus einer sehr großen Anzahl von Mäusen, die etwa zum selben Zeitpunkt geworfen hatten, wurden solche mit Jungenzahlen von 9-11 ausgewählt. Als Kontrolltiere dienten die üblichen weiblichen Normalmäuse.
Anzahl der Versuchstiere in den beiden Gruppen: $n_1 = n_2 = 15$.- Es wurde nur ein Versuch gemacht.
Parasitendosis: $1{,}3 \cdot 10^6$.
- Eine Parasiten-Zähl-Stichprobe erfolgte am 8. Tag der Krankheit.-
Schematisch also:



Schematische Darstellung der Anordnung von Versuch IIIAd.

7) Ergebnis

1,) Parasiten-Zähl-Stichprobe am 8. Tage p.i.:

Bei den Mäusen mit entfernten Jungen ("Mutter"-Tiere) wurde bestimmt:

30080 ± 2790 Trypanosomen / mm^3 Blut,

bei den Kontrolltieren:

71680 ± 1690 Tryp./ mm^3 Blut

Graphisch veranschaulicht ergibt sich das Bild:

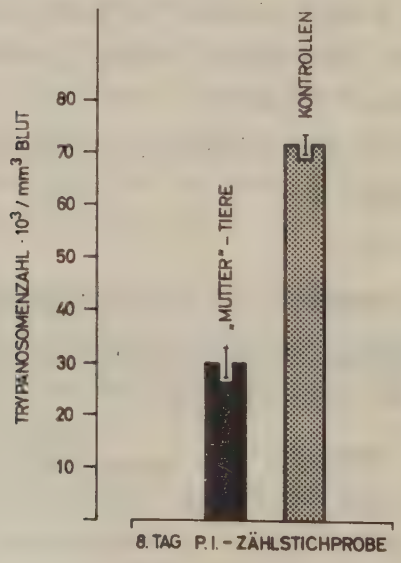


ABB. 9

Graphische Darstellung des Ergebnisses der Parasiten-Zähl-Stichprobe am 8. Tage p.i. von Versuch III/d.

Zur Absicherung der beiden Stichproben - Mittelwerte diene die graphische Eintragung ihrer mittleren Fehler. Der Unterschied ist deutlich.

2.) Lebenszeit p.i.:

Tier Nr.	LEBENSTAGE P.I.	
	"Mutter"-Tiere x_i	Kontrollen y_i
1	10	9
2	11	9
3	11	8
4	10	11
5	12	10
6	12	9
7	11	10
8	10	8
9	9	10
10	11	10
11	10	10
12	11	10
13	10	10
14	11	10
15	11	10
n=15	$\bar{x}$ =10,7	$\bar{y}$ =9,6
	s = 0,82	s =0,83
	$s_{\bar{x}}$ = 0,21	$s_{\bar{y}}$ =0,21

TAB. 6

Lebenstage p.i. von Mäusen, denen unmittelbar nach der Geburt und unmittelbar vor der Infektion die Jungen genommen wurden und Kontrolltieren.

$t_f = 3,7$; ($f = 28$) ; $p < 0,001$

Die Differenz der beiden Datenreihen ist also sehr gut gesichert. Die Nullhypothese muß also auch für die Sterbezeit von Mäusen, denen die Jungen entfernt wurden, in Bezug auf normale Kontrolltiere abgelehnt werden.

e) Untersuchung des Krankheitsverlaufes von acht Tage nach Beendigung der Lactation infizierten Mäusen.

α) Fragestellung:

Wie verhalten sich bezüglich Parasitämie und Sterbezeit Mäuse - verglichen mit Kontrolltieren - acht Tage nach Beendigung der Lactationszeit infiziert? (Die Lactationszeit der Maus dauert ca. 21 Tage. In der vierten Woche saugen die Jungen zwar noch immer wieder, sind aber schon in der Lage, sich selbständig zu ernähren.) - Besteht also das Phänomen der Vermehrungshemmung der Parasiten in der Lactationszeit und das der verlängerten Lebenszeit noch über diese hinaus?

β) Versuchsanordnung

Die Jungtiere - 10 pro Muttertier, am selben Tage geboren, wurden 25 Tage bei den Müttern gelassen und dann weggenommen. Die Infektion erfolgte acht Tage nach der Entfernung der Jungen. Es wurde ein Versuch gemacht. Zahl der "Mutter"-Tiere: $n_1 = 44$ (ein "Mutter"-Tier starb wenige Stunden nach der Infektion aus ungeklärten Gründen und wurde als "Ausreißer" betrachtet).- Zahl der

Kontrollen: n_2 = 15.

Parasitendosis: $1{,}3 \cdot 10^6$ Tryp./Maus

Eine Parasiten-Zähl-Stichprobe erfolgte wieder um an

8. Tage nach der Infektion.

Wieder schematisch:

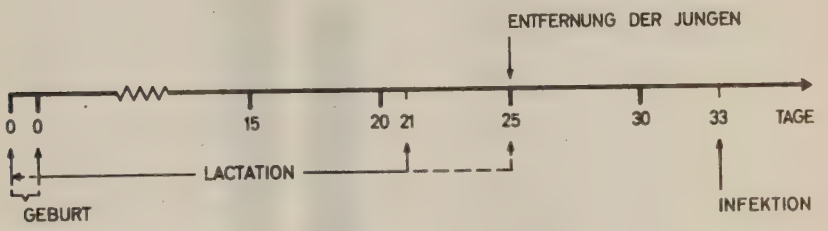


Abb. 10

Schematische Darstellung der Anordnung von Versuch III/c

γ) Ergebnis

α) Parasiten-Zähl-Stichprobe am 8. Tage p.i. (≙ 8 Tage nach Beendigung der Lactation):

"Mutter" - Tiere: 74272 ± 9680 Try./mm^3 Blut

Kontrollen : 78240 ± 6600 Try./mm^3 "

Graphisch veranschaulicht:

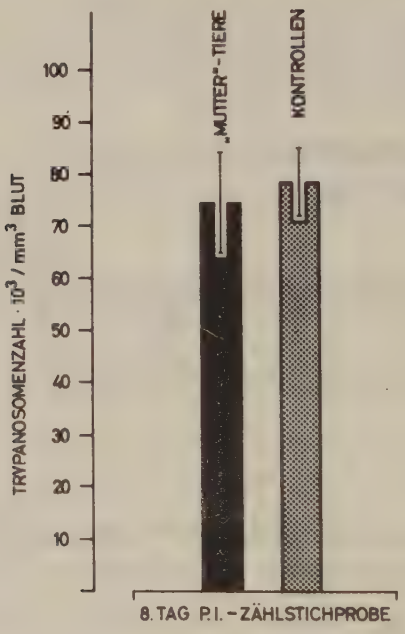


Abb. 11

Graphische Darstellung des Ergebnisses der Parasiten-Zähl-Stichprobe am 8. Tage p.i. von Versuch III/e.

Die Darstellung der mittleren Fehler der beiden Stichproben-Mittelwerte zeigt, daß kein Grund besteht, diese als unterschiedlich anzusehen.

2.) Lebenszeit p.i.:

Tier Nr.	LEBENSTAGE P.I. "Mutter"-Tiere x_i	Kontrollen y_i
1	10	9
2	11	10
3	11	11
4	11	11
5	10	10
6	11	10
7	11	10
8	11	10
9	11	11
10	12	11
11	12	10
12	12	11
13	10	12
14	11	10
15	;	10
n_1=14	$\bar{x}$ =11,0	$\bar{y}$ =10,4
n_2=15	s = 0,68	s = 0,74
	$s_{\bar{x}}$ = 0,11	$s_{\bar{y}}$ = 0,19

TAB. 7 : Lebenstage p.i. von acht Tagen nach Beendigung der Lactation infizierten Mäusen und Kontrolltieren.

$t_f = 0,72$; $(f = 27)$; $p > 0,05$

Es besteht also kein Anlaß, die Nullhypothese zu verwerfen. Die Differenz der mittleren Lebenszeit der beiden Tiergruppen muß bei der vorhandenen Versuchstierzahl als zufällige Stichprobenabweichung angesehen werden. - Also bereits 8 Tage nach Beendigung der Lactationsperiode müssen "Mutter"-Tiere und weibliche Normalmäuse wieder einer einheitlichen Bevölkerung zugerechnet werden.

f) Einfluß verschiedener Jungenzahlen auf den Krankheitsverlauf lactierender Mäuse

α) Fragestellung:

Das Ergebnis des Versuches c) - Vergleich lactierender, am 10. Lactationstag infizierter Mäuse mit lactierenden, unmittelbar nach der Geburt infizierten- legt den Verdacht auf einen Einfluß der Jungenzahl auf den Verlauf der Parasitämie und auf die Sterbezeit nahe. Der Versuch sollte der Prüfung des Einflusses der Saugintensität der Jungtiere - repräsentiert durch verschiedene Jungenzahlen - dienen.
Der Versuch d) zeigte nur den Unterschied zwischen Normaltieren und Tieren nach Verlust der Jungen. Der Versuch f) sollte zweitens zur Fragestellung nach einen etwaigen Unterschied hinsichtlich Parasitämie und Sterbezeit zwischen Mäusen, die ihre Jungen nach der Geburt behielten und solchen, denen sie genommen wurden, beitragen. Somit handelte es sich auch um einen indirekten Kontrollversuch von Versuch d).

β) Versuchsanordnung

Gegenübergestellt wurden drei Gruppen zu je 15 Tieren: $n_1 = n_2 = n_3 = 15$.

Gruppe I : 10 Junge /Muttertier
" II : 1 Junges/ "
" III: Kein Junges

Die Entfernung der Jungen in den Gruppen II und III fand unmittelbar nach der Geburt (12h) statt, ebenfalls die Infektion.

Parasitendosis: $1{,}3 \cdot 10^6$ Tryp./ Maus.

Analogie-Schema: vgl. Abb. 6!

Eine Zähl-Stichprobe der Trypanosomen erfolgte ebenfalls am 8. Tage p.i. .

7) Ergebnis

a.) Parasiten-Zähl-Stichprobe am 8. Tage p.i.:

Gruppe I (10 Junge/Tier) : $\bar{x} = 22500 \pm 2530$ Try./mm^3 Blut

" II (1 Junges/Tier) : $\bar{y} = 26192 \pm 2770$ Try./mm^3 Blut

" III (Kein Junges) : $\bar{z} = 25872 \pm 2670$ Try./mm^3 Blut

(Die Zahlenwerte der beiden "Ausreißer" Nr. 4 und 11 in Gr. I wurden in keine der Berechnungen, also auch nicht in die für die Lebenszeit p.i., aufgenommen.)

In graphischer Darstellung:

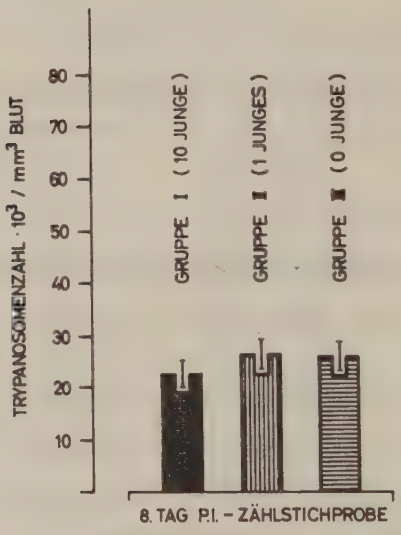


ABB. 12

Graphische Darstellung des Ergebnisses der Parasitenzähl-Stichprobe am 8. Tage p.i. von Versuch IIIAf.

Die mittleren Fehler zeigen wieder, daß gesichert unterschiedliche Parasitenzahlen nicht vorliegen. Die Zählwerte sind homogen.

2.) Lebenstage p.i.:

Tier Nr.	LEBENSTAGE P.I.		
	Gruppe I x_i	Gruppe II y_i	Gruppe III z_i
1	überl.	10	13
2	16	11	13
3	12	10	12
4	(23)	9	9
5	10	10	10
6	13	9	11
7	12	9	10
8	11	10	11
9	10	15	10
10	10	10	12
11	(21)	10	10
12	12	10	10
13	13	11	11
14	11	13	13
15	12	10	10
n=15	$\bar{x}$ =11,8	$\bar{y}$ =10,5	$\bar{z}$ =11,0
	s = 1,62	s = 1,6	s = 1,31
	$s_{\bar{x}}$ = 0,47	$s_{\bar{y}}$ = 0,41	$s_{\bar{z}}$ = 0,34

TAB.8

Lebenstage p.i. von drei infizierten Mäusegruppen mit verschiedenen Jungenzahlen (Gr.I = 10 Junge; Gr. II = 1 Junges; Gr. III = 0 Junge).

Zur Untersuchung des Zahlenmaterials wird die Varianzanalyse herangezogen:

Ursprung der Variabilität	Summe der Abweichungsquadrate	Zahl der Freiheitsgrade	Varianz	Varianzverhältn.
Zwischen den Gruppen	12,60	2	6,30	
Innerhalb der Gruppen	91,40	39	2,34	$F = \frac{6,30}{2,34} = 2,69$

Das aus den Versuchswerten berechnete F hat die Freiheitsgrade 2 und 39. Der Vergleich mit dem bei 5% Überschreitungswahrscheinlichkeit signifikanten Wert (3,235) zeigt, daß keine Signifikanz vorliegt. Aus diesem Versuch läßt sich also kein gesicherter Hinweis dafür ableiten, daß sich Mäuse mit 10 Jungen, 1 Jungen und solche mit sofort nach der Geburt entfernten Jungen hinsichtlich ihrer Lebenszeit nach der Infektion verschieden verhalten. Allerdings ist auffällig, daß nur in Gruppe I (10 Junge) ein Tier überlebte. Ferner enthält nur diese Gruppe zwei Tiere mit überlanger Lebenszeit ("Ausreißer").

g) Versuche mit gestuften Parasitendosen in Normalmäusen

α) Fragestellung:

Die bisher stets pro Tier verwendete Parasitendosis

($1{,}3 \cdot 10^6$) war extrem hoch. Dennoch fand sich im Vergleich zu den Kontrolltieren eine niedrigere Parasitämie sowie eine längere Lebenszeit p.i. lactierender Mäuse. Es erscheint nun von Interesse, die Folge der Verabreichung kleinerer Trypanosomendosen auf den Krankheitsverlauf lactierender Mäuse zu prüfen. Besondere Bedeutung kommt aber für diese Frage derjenigen Parasitendosis zu, die gerade zum Absterben aller Normaltiere führt, bzw. der Dosis, bei der bereits mit überlebenden Tieren zu rechnen ist. - Untersucht wurde im Hinblick auf diese Fragestellung die Folge der Infektion von weiblichen Normalmäusen mit verschiedenen Parasitenmengen auf Parasitämie, Absterbezeit und -rate.

β) Versuchsanordnung

Es wurden 5 Gruppen (I - V) weiblicher Mäuse zu je 7 Tieren bezüglich Präpatenz- und Absterbezeit miteinander verglichen. Die Tabelle zeigt die pro Tier verabreichte Trypanosomenmenge:

Gruppe	Tryp.-Zahl $\cdot 10^6$ / Tier
I	1,00
II	0,70
III	0,40
IV	0,10
V	0,05

TAB. 9 : Die in dem Dosis-Wirkungs-Versuch verimpften Trypanosomenzahlen (Anzahl der Mäuse / Gruppe: n = 7).

Um das Versuchsziel zu erreichen, wurde der Dosis-Raster sehr eng gelegt. Das ist mit der entwickelten Methode des "inversen Dreisatzes" leicht und exakt zu erreichen. - Besonders sorgfältig ist in diesem Experiment der Beginn der Parasitämie geprüft worden. Täglich wurden nach der Infektion von jeder Maus drei Präparate des "Dicken Tropfens" (1 Tropfen zu 0,004ml Blut) angefertigt. Positiver Befund galt als Beginn der sichtbaren Parasitämie.

γ) Ergebnis

α) Präapparenzzeit

Die Tabelle zeigt den Beginn der Parasitämie nach der Infektion in den Mäusen der einzelnen Versuchstiergruppen:

	Beginn der Parasitämie - Tage p.i. -							
Gruppe	4	5	6	7	8	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	R
I	5	2				4,3	0,18	1
II	3	4				4,6	0,20	1
III		5	2			5,3	0,18	1
IV				7		7,0	-	0
V				2	5	7,7	0,18	1
	Anzahl der Tiere							

TAB. 10

Sichtbarwerden der Trypanosomen im peripheren Blut der Mäuse in Abhängigkeit von verschiedenen Dosen.

Der Graph der Funktion hat das Aussehen:

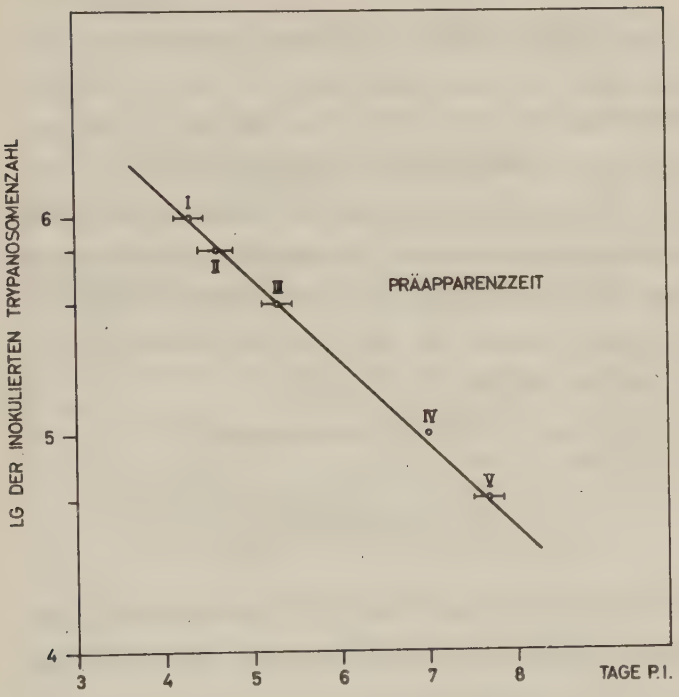


ABB. 13

Graph der Präapparenzfunktion von T. cruzi in Abhängigkeit von der Parasitendosis.

Wie aus der Abb. 13 zu ersehen ist, gehorcht die Präapparenzzeit von T. cruzi einer negativen, logarithmischen Funktion nach der Dosis der inokulierten Trypanosomenzahl. Die Funktion hat im untersuchten Bereich die allgemeine Form einer Exponentialgleichung vom Typ

$$y = f(t) = C \cdot e^{-kt}$$

bzw.

$$\log y = \log C - k \cdot t \cdot \log e$$

Die Gleichung ist also linear in x und log y. Der G r a p h der dargestellten Funktion gestattet, jederzeit auf einfache Weise den wahrscheinlichen mittleren Beginn der sichtbaren Parasitämie in Abhängigkeit von der injizierten Trypanosomenmenge vorauszusagen; beispielsweise den Tag, von dem ab eine tägliche Parasitenzählung sinnvoll wird.
Zahlenmäßig ergibt sich das Gleichungsbild:

$$\boxed{y = f(t) = 4{,}3 \cdot 10^{7} \cdot e^{-0{,}87t}}$$

Da man aber in der Regel nicht die inokulierten Trypanosomen y aus der Zahl der Tage p.i. (t) errechnen wird, ist die Umkehrfunktion

$$t \approx -\frac{1}{0{,}38} \cdot \log y + \frac{7{,}63}{0{,}38} \quad ;$$

$$\boxed{t \approx -2{,}63 \cdot \log y + 20{,}1}$$

also die Errechnung der Apparenzzeit (Tage p.i. = t) aus der inokulierten Trypanosomenzahl y, von größerem praktischen Wert.

2.) Todestag

Die Tabelle zeigt analog der der Latenzzeit die Sterbetage der Mäuse innerhalb der einzelnen Versuchstiergruppen:

	TODESTAG Tage p.i. -												
Gruppe	11	12	13	14	15	16	17	18	19	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	R	Überl.
I	4	2	1							11,6	0,30	2	0
II	2	1	4							12,3	0,36	2	0
III		3	4							12,6	0,20	1	0
IV			2	1	1	2				14,5	0,55	3	1
V					1	0	3	1	1	17,2	0,54	4	1
	Anzahl der gestorbenen Tiere												

T.B. 11

Todestage von T. cruzi - infizierten Mäusen in Abhängigkeit von verschiedenen injizierten Parasitendosen.

Und wieder in graphischer Darstellung:

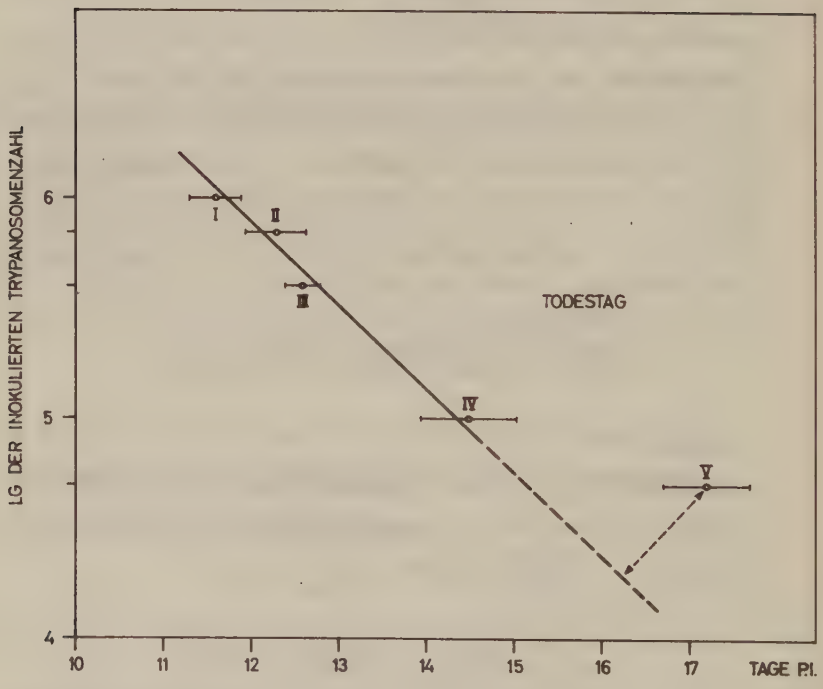


ABB. 14

Graph der Funktion der Todestage T. cruzi infizierter Mäuse in Abhängigkeit von der Parasitendosis.

Ähnlich den Maßzahlen der Latenzzeit folgt auch der Graph der Zahlenwerte der Sterbezeit in zufriedenstellender Annäherung einer e-Funktion vom Typ

$$y = f(t) = C \cdot e^{-kt} \quad .$$

Allerdings nur im Dosisintervall I ($= 1{,}0 \cdot 10^6$ Tryp./Maus) bis IV ($= 100 \cdot 10^3$ Tryp./Maus) . Die Ausgleichsgerade wurde ebenso wie in Abb.13 nach Augenmaß gezogen, also nicht mit Hilfe der Regressionsrechnung ermittelt. Die Parasitämiedauer (d) der Tiere der Gruppen I bis IV erscheint statistisch homogen. Diese Vermutung wird mit Hilfe des F-Testes geprüft:

	PARASITÄMIE - DAUER (= Todestag - Präapparenzzeit)				
Tier Nr.	I	II	III	IV	V
1	7	7	7	6	8
2	7	7	7	6	10
3	7	8	7	7	9
4	7	8	8	8	9
5	8	8	8	9	10
6	7	8	7	9	11
7	8	8	7	überl.	überl.
n=7	$\bar{x}_I = 7{,}3$	$\bar{x}_{II} = 7{,}7$	$\bar{x}_{III} = 7{,}3$	$\bar{x}_{IV} = 7{,}5$	$\bar{x}_V = 9{,}5$ $s = 1{,}05$ $s_{\bar{x}} = 0{,}43$

TAB.12

Sichtbare Parasitämiedauer bei verschiedenen injizierten Trypanosomendosen.

Ergebnis der Varianzanalyse mit den Daten der obigen Tabelle (Zusammenfassung):

Ursprung der Variabilität	Summe der Abweichungsquadrate	Zahl der Freiheitsgrade	Varianz	Varianzverhältn.
Zwischen den Gruppen	0,97	3	0,323	
Innerhalb der Gruppen	13,70	23	0,596	$F = \frac{0,323}{0,596} = 0,54$

Der Vergleich mit dem Tabellenwert für die beiden errechneten Freiheitsgrade (F = 3,03) zeigt, daß die Maßzahlen der Parasitämiedauer der Gruppen I bis IV tatsächlich als statistisch homogen zu betrachten sind. Die Nullhypothese trifft zu.

Der Versuch zeigte also, daß in dem untersuchten Parasitendosisbereich die mikroskopisch feststellbare Parasitämiedauer d unabhängig von der Dosis konstant ist. Die Fehlerrechnung ergibt einen Zeitraum von 7,44 $\pm$ 0,14 Tagen (s = 0,75) . Nur in dieser Zeit - etwa rückgerechnet vom durchschnittlichen Todestag - lassen sich im peripheren Blut Parasiten finden. D.h. ferner : der Graph der Maßzahlen der Präapparenzzeit verläuft parallel dem der Todestag - Werte. In Abhängigkeit von der Dosis. Wichtig ist also im untersuchten Bereich vornehmlich

die Kenntnis der Präapparenz-Funktion; denn nur diese Zeit ist inkonstant. Bildlich dargestellt:

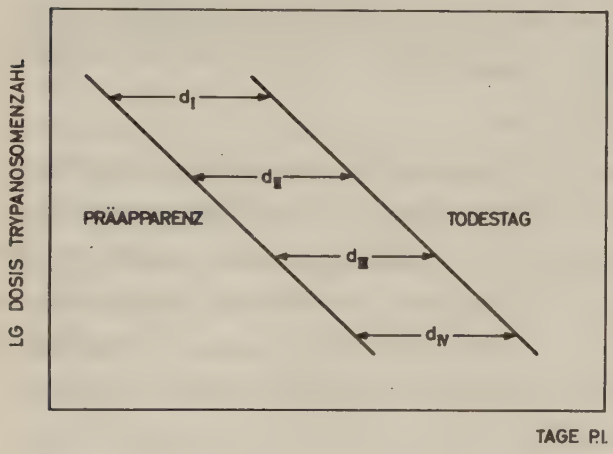


ABB. 15

Schematische Darstellung der Konstanz der sich ebaren Parasitämiedauer im Dosisbereich 10^5 bis 10^6 Tryp./ Maus.

$d_I = d_{II} = d_{III} = d_{IV} = 7,44 \pm 0,14$ [Tage].

Formelmäßig gilt demnach für die Krankheitsdauer (D_K) :

$$D_K = P + d =$$
$$= P + 7,44 \pm 0,14 \text{ [Tage]},$$

wobei P die Präapparenzperiode bedeutet und d die Parasitämiedauer.

Mit Hilfe des t-Testes nach Formel IV werden die Werte

der Spalte V mit denen der Spalte I bis IV verglichen. In der Tat läßt sich der Unterschied mit $t = 5{,}64$ ($f = 31$), also $p < 0{,}001$ sichern.

h) Infektion lactierender Mäuse mit niedrigeren Parasitendosen als bisher (Konsequenzen aus Versuch g)

α) Fragestellung

Wie wirken sich niedrigere Parasitendosen als die bisher stets verwendete Dosis ($1{,}3 \cdot 10^6$ Tryp./Maus) auf den Verlauf dieser Trypanosomiasis der Maus in der Lactationszeit aus? Untersucht werden soll der Verlauf der Parasitämie sowie Absterbezeit und -rate. Als Arbeitsmuster dienen die im Vorversuch (Versuch g) gesammelten Erfahrungen.

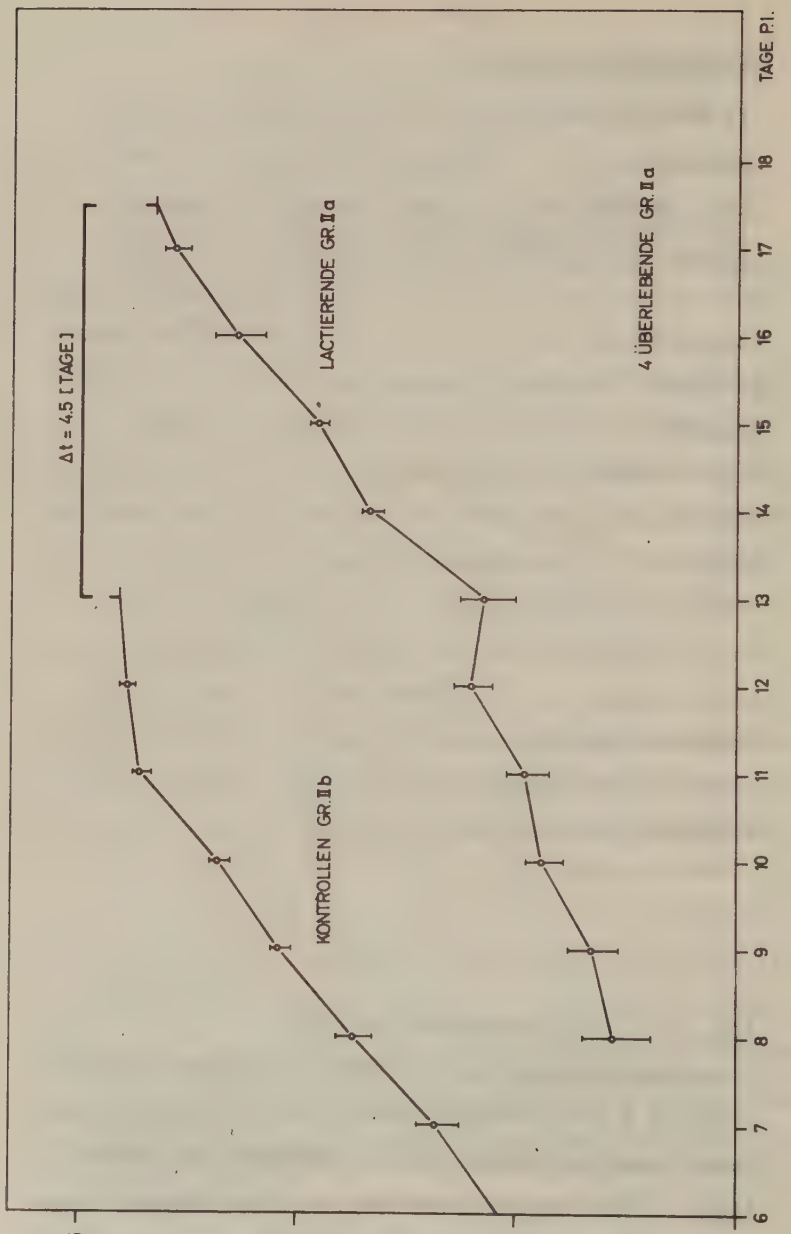
Es wurden zwei Dosen angewandt:

1.) $700 \cdot 10^3$ Tryp./Maus und 2.) von besonderem Interesse: eine Dosis, bei der gerade noch mit dem Tode aller normalen Mäuseweibchen zu rechnen ist. Diese gesuchte Dosis muß nach dem Ergebnis des Vorversuches über $100 \cdot 10^3$ Tryp./Maus liegen (Dosis IV) ; hier überlebte noch ein Tier. Andererseits überlebte bei Dosis III - $400 \cdot 10^3$ Tryp./Maus - kein Tier. Die gesuchte Dosis liegt also nach den Erfahrungen von Versuch g) zwischen $|100 \cdot 10^3|$ und $|400 \cdot 10^3|$. Wie das Versuchsergebnis zeigt, erfüllte die Dosis von $250 \cdot 10^3$ Tryp./Maus die gesetzte Erwartung.

β) Versuchsanordnung

Wie erwähnt, wurden für die Mäusegruppen zwei Dosen angewendet: $700 \cdot 10^3$ und $250 \cdot 10^3$ Tryp./Maus. Die folgende Tabelle zeigt übersichtlich die Versuchsbedingungen. Tierzahl pro Versuch und Gruppe: n = 10. - W i e d e r h o l u n g s v e r s u c h : n = 10 . Allerdings unterscheidet sich das Wiederholungsexperiment vom Erstexperiment. Denn nur im ersten wurden die Mäuse täglich bezählt, nicht im zweiten. Anlaß dazu gab eine Arbeit von KNOESCHKER und HAAKH (80) . Die Autoren vertreten die Ansicht, daß durch die Beunruhigung der Tiere beim Hantieren (Blutentnahme, Messungen) der Verlauf der N a g e t i e r m a l a r i a (Plasmodium berghei) in der Laboratoriumsmaus entscheidend beeinflußt wird. Um zu prüfen, ob dergleichen auch für die T. cruzi - Infektion der Maus zutrifft, wurde im Wiederholungsversuch streng jede Beunruhigung der Tiere vermieden, die Mäuse also auch nicht bezählt.

ABB. 16 (auf der nächsten Seite)
Parasitämieverlauf nach Infektion mit einer Trypanosomendosis ($250 \cdot 10^3$ Tryp./Maus), die für Normaltiere gerade noch im Bereich voller tödlicher Wirksamkeit liegt. - Die Parasitämiekurven der überlebenden Mäuse sind der Übersichtlichkeit halber nicht eingezeichnet.


LG TRYPANOSOMENZAHL / mm³ BLUT
TAGE P.I.
Δt = 4.5 [TAGE]
KONTROLLEN GR.IIb
LACTIERENDE GR.IIa
4 ÜBERLEBENDE GR.IIa
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18

Wie Abb. 16 demonstriert, liegt nun die Parasitämiekurve der lactierenden Mäuse der Gruppe IIa im Vergleich zu der der Kontrolltiere (IIb) wesentlich niedriger als je zuvor. Die Absicherung der Kurven gegeneinander erfolgte wieder durch die graphisch eingetragenen jeweiligen mittleren Fehler. - Die Parasitenbürden der Kontrolltiere reichen vom etwa 10- bis zum nahezu 30-fachen der der lactierenden Mäuse. Die Parasiten der Gruppe IIb tauchten ganz gemäß dem Ergebnis von Versuch g) (siehe Abb. 13!) im Blut auf; die der Lactierenden zwei Tage später. Entsprechender Zählungsbeginn. Die Parasitämiekurve der überlebenden 4 Tiere der Gruppe IIa ist nicht eingezeichnet. Die Kurve stammt also von 6 Mäusen. - Bei einer überlebenden Maus waren nur an zwei Tagen Trypanosomen im "Dicken Tropfen" zu sehen. Die Trypanosomen der anderen Mäuse verschwanden zwischen dem 20. und 30. Tage p.i. aus dem Blut.
Obwohl die Mäuse der Infektionsdosis $|700 \cdot 10^3|$ (Gr.Ia/Ib) täglich bezählt wurden, sind ihre Parasitämiekurven nicht eigens abgebildet. Das Bild stimmt mit allen bisherigen Erfahrungen überein: die Parasitämiekurve der lactierenden Mäuse liegt auch hier gesichert unter der der Kontrolltiere.

2.) Lebenszeit p.i.

		BEZÄHLTE TIERE			
Gruppe Tryp.Dosis		Lact. Ia $700 \cdot 10^3$	Kontr. Ib $700 \cdot 10^3$	Lact. IIa $250 \cdot 10^3$	Kontr. IIb $250 \cdot 10^3$
T	1	15	11	überl.	14
i	2	15	11	17	12
e	3	20	12	17	12
r	4	überl.	12	überl.	13
	5	16	12	überl.	13
Nr.	6	16	10	15	13
	7	überl.	11	21	14
	8	17	13	16	12
	9	14	13	19	13
	10	15	12	überl.	14
		$\bar{x}_{Ia}=16,0$	$\bar{x}_{Ib}=11,7$	$\bar{x}_{IIa}=17,5$	$\bar{x}_{IIb}=13,0$
		$s = 1,84$	$s = 0,95$	$s = 2,10$	$s = 0,81$
		$s_{\bar{x}} = 0,65$	$s_{\bar{x}} = 0,30$	$s_{\bar{x}} = 0,88$	$s_{\bar{x}} = 0,25$

		UNBEZÄHLTE TIERE			
Gruppe Tryp.Dosis		Lact. Ia' $700 \cdot 10^3$	Kontr. Ib' $700 \cdot 10^3$	Lact. IIa' $250 \cdot 10^3$	Kontr. IIb' $250 \cdot 10^3$
T	1	15	12	überl.	14
i	2	16	13	überl.	14
e	3	15	11	überl.	15
r	4	15	11	überl.	12
	5	13	11	(37)	14
Nr.	6	15	13	17	12
	7	17	11	17	12
	8	überl.	12	überl.	13
	9	14	12	16	12
	10	19	12	überl.	13
		$\bar{x}_{Ia'}=15,4$	$\bar{x}_{Ib'}=11,8$	$(\bar{x}_{IIa'}=16,7)$	$\bar{x}_{IIb'}=13,1$
		$s = 1,74$	$s = 0,78$	$s = 0,58$	$s = 1,10$
		$s_{\bar{x}} = 0,58$	$s_{\bar{x}} = 0,25$	$s_{\bar{x}} = 0,33$	$s_{\bar{x}} = 0,35$

Tab. 13: Lebenszeit p.i. von Mäusen, die mit niedrigeren Parasitendosen als bisher infiziert wurden. (Täglich bezählte und unbezählte Tiere)

Die statistische Auswertung dieser Tabelle ergibt weiterhin:

Verglichene Gruppenwerte	Student-Variable t	Zahl der Freiheitsgrade	Wahrscheinlichkeit p
Ia/ Ib	6,62	16	<0,001
IIa/IIb	5,98	14	<0,001
Ia'/Ib'	5,90	17	< ,001
Ia /Ia'	0,06	15	>0,05
Ib /Ib'	0,25	18	>0,05
IIb/IIb'	0,23	18	>0,05

TAB. 14

Statistische Auswertung der in Tab. 13 gezeigten Ergebnisse.

Ein Vergleich der beiden Gruppen IIa' / IIb' erscheint in Anbetracht von 6 überlebenden Tieren in Gruppe IIa' und einem "Ausreißer" (Tier Nr. 5) überflüssig. Die Differenz der Mittelwerte der Todestage der in den ersten drei Zeilen der Tabelle aufgeführten Gruppenpaare ist also hochsignifikant gesichert. Die Gruppen IIa und IIa' ($250 \cdot 10^3$ Tryp./ Tier) zeigen, daß man bei Anwendung dieser Dosis im Mittel etwa mit dem Überleben etwa der Hälfte der lactierenden Mäuse rechnen darf. Keines der Normaltiere überlebte diese Dosis.

Andererseits läßt sich aus den Zahlenwerten des Versuches keinerlei Anhalt dafür finden (Zeile 4–6 der Tabelle), daß Beunruhigung der Tiere durch tägliches Paracitenzählen bei T. cruzi den Krankheitsverlauf beeinflußt.- Bei der geringen Infektionsdosis (Gruppe IIa und IIa') war kaum Junghefressen feststellbar.

i) Deckversuch mit den sechs überlebenden weiblichen Mäusen der Gruppe IIa' von Versuch h)

α) Fragestellung:

Sind die überlebenden Mäuse des Versuches h) noch fortpflanzungsfähig? Oft sind u.a. die Gonaden von der Leishmaniaform des Trypanosoms befallen. - Lassen sich zweitens etwa latent vorhandene Trypanosomen, mit denen gerechnet werden muß, durch eine Graviditität gemäß dem Ergebnis von Versuch a) zur Vermehrung bis in den Bereich der Sichtbarkeit - etwa im "Dicken Tropfen" - provozieren?

β) Versuchsanordnung

Die 6 überlebenden Tiere wurden 40 Tage nach der Infektion drei Tage lang zu Männchen (Verhältnis 1:1; pro Käfig ein Pärchen) gesetzt. Der "Dicke Tropfen" (3 Tropfen à 0,004 ml) zeigte am Decktage in keinem Falle auch nur ein Trypanosom.

γ) Ergebnis

Nach einer normal langen Trächtigkeitsdauer (20 - 21

Tage) gebaren vier der Weibchen gesunde und kräftige Junge: 8,9,8 und 11. Dieser Deckerfolg entspricht völlig den Erwartungen bei gesunden, gebärfähigen Normalmäusen. - Regelmäßige Kontrolle des Blutes im Abstand von drei Tagen nach der dreitägigen Deckzeit zeigte in keinem Falle ein Trypanosom.

j) Ermittlung der prämortalen Trypanosomenzahl/mm^3 Blut von lactierenden Mäusen und weiblichen Normaltieren.

Untersucht wurden sämtliche im Verlauf der Versuche bei lactierenden Mäusen und weiblichen Normalmäusen gefundene prämortale Trypanosomen ergen/mm^3 Blut. Es werden nur Mäuse der Infektionsdosis $1{,}3 \cdot 10^6$ tryp./Tier für die Berechnung herangezogen. Die entsprechenden lactierenden Tiere sind nur unmittelbar nach der Geburt (24h) infizierte. - prämortal - d.h. bis 12h vor dem Tode.

Es ergibt sich:

	Trypanosomen $\cdot 10^3/mm^3$				
	$\bar{x}$	s	$s_{\bar{x}}$	R	n Mäuse
Lactierende	53,54	37,21	6,00	154,80	38
Normaltiere	87,38	58,83	7,13	255,40	68

Tab. 15

Prämortale Trypanosomenzahlen $\bar{x}$ von lactierenden und normalen Mäusen mit den zugehörigen statistischen Angaben.

Die mittlere prämortale Trypanosomenzahl beträgt also bei lactierenden Mäusen 53540 ± 600 Tryp./mm^3 Blut und bei weiblichen Normaltieren 87380 ± 7130. Allerdings ist die Zahl der Werte der Normaltiere fast doppelt so groß. Das hier größere Zahlengut rührt zu einem guten Teil von bezählten Spendertieren her, von denen meist nur wenige getötet wurden.
Die mittleren prämortalen Trypanosomenzahlen der beiden Tiergruppen werden mit Hilfe des t - Testes auf statistische Einheitlichkeit geprüft. Nach Formel IV) ergibt die Rechnung

$$t_f = 3{,}21;$$
$$f = 68 + 38 - 2 = 104;$$
$$p < 0{,}01;$$

Die Nullhypothese muß folglich abgelehnt werden. Lactierende Tiere sterben mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0{,}01$ bei einer geringeren Parasitenmenge / mm^3 Blut als normale weibliche Mäuse. Es ist also n i c h t gestattet, die Tiere nach den vorliegenden Zählwerten bezüglich der prämortalen Trypanosomenmenge einem einheitlichen Kollektiv zuzuordnen.

Untersuchung der Verteilung der prämortalen Trypanosomenmenge/mm^3 Blut der weiblichen Normaltiere (n=68):

Die Fragwürdigkeit , ein Verteilungsbild mit so geringer Datenzahl zu erstellen, ist mir voll bewußt. Deshalb

wird auch darauf verzichtet, ein Verteilungsbild der Zählwerte der lactierenden Mäuse zu bekommen.

Ziel des Vorgehens:

1.) Veranschaulichung des Verteilungsbildes im cartesischen Netz,

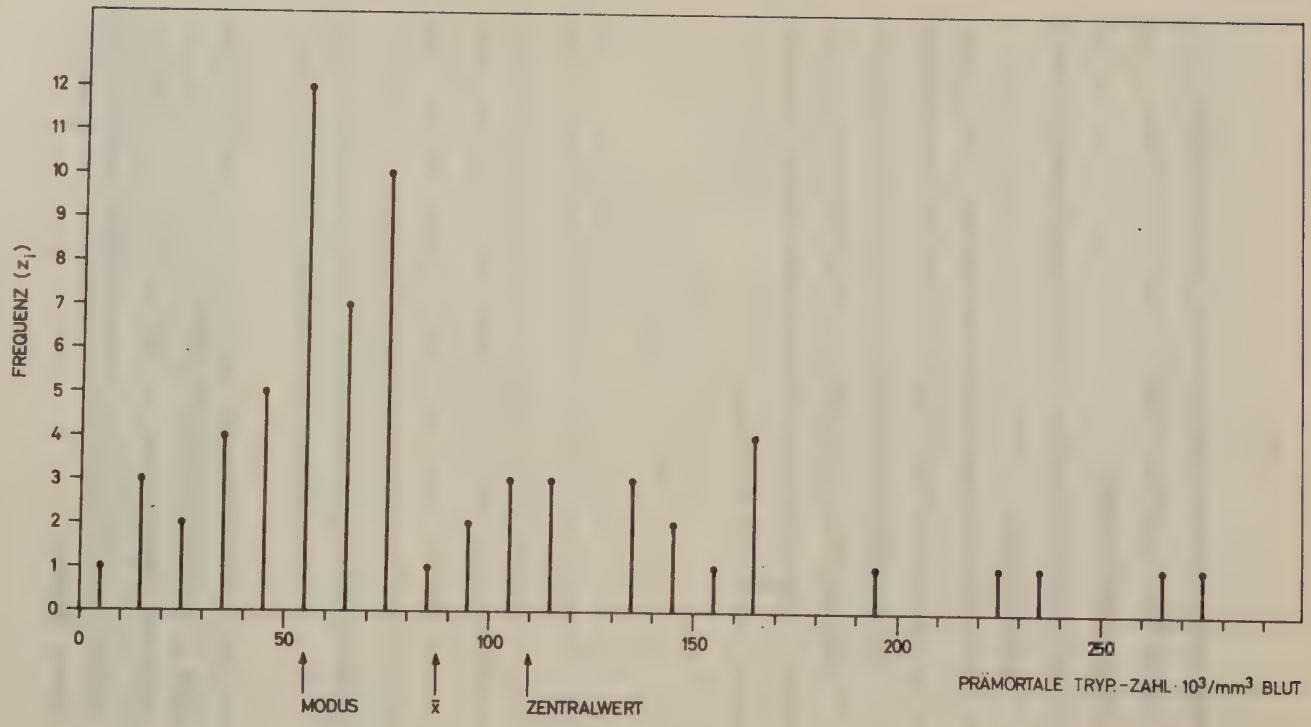
2.) Prüfung auf etwaige Normalverteilung,

3.) Transposition des Graphs der Verteilungsfunktion mit geeigneten Mitteln in eine Gerade zum Zwecke besserer Erfaßbarkeit und Abschätzbarkeit.

Als K l a s s e n b r e i t e wurden $1{,}0 \cdot 10^3$ Trypanosomen / mm^3 Blut festgelegt.

Abb. 17 (auf der nächsten Seite)

Graphische Darstellung der Häufigkeit (z_1) der gefundenen prämortalen Trypanosomenzahlen normaler weiblicher Mäuse.


FREQUENZ (z_i)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
0
50
100
150
200
250
MODUS
$\bar{x}$
ZENTRALWERT
PRÄMORTALE TRYP.-ZAHL · $10^3/mm^3$ BLUT

Mittelwert ($\bar{x}$), Modus und Zentralwert liegen weit auseinander. Eine mathematische Prüfung auf Normalverteilung erster Art(etwa mit Hilfe des χ^2- Testes oder graphisch mit Hilfe des Wahrscheinlichkeitsnetzes) erübrigt sich auf den ersten Blick. Vielmehr handelt es sich um eine linksassymmetrische Verteilung des Idealfalles $y = f(x) = x^{-\ln x}$. - Tatsächlich nimmt der Graph der Funktion im logarithmischen Wahrscheinlichkeitsnetz - Abszissenachse logarithmisch, Ordinatenachse nach dem Gauß'schen Integral geteilt (90) - in einigermaßen zufriedenstellender Annäherung die Form einer Geraden an (S. 79).

Schon an dieser Stelle sei zur Auswertung ein Einwand gegen die Anwendung des t-Testes erhoben, da die Verteilung der prämortalen Trypanosomenzahlen nicht durch eine Gauß'sche Kurve angenähert werden kann. Wollte man sich nicht mit der einfachen tabellarischen bzw. graphischen Repräsentation des Versuchsergebnisses begnügen, wäre ein parameterfreier Test (sog. Rangordnungstest) geeignet. - Klar zu sein hat man sich auch darüber, daß die Anpassung der Verteilungskurve auf S. 77 an eine Gerade nur Ergebnis einer formalen Manipulation ist.

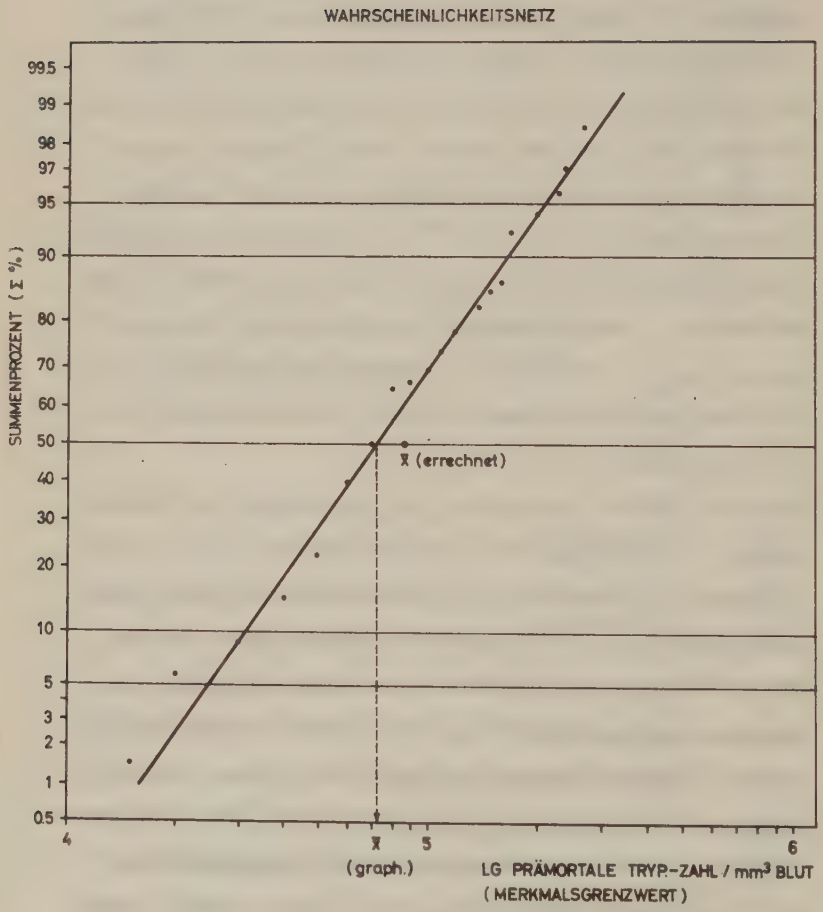


ABB. 18

Das in Abb. 17 gezeigte Ergeb is im Wahrscheinlichkeitsnetz zweiter Art.

k) Zur Frage der Abwehrlage von Jungen infizierter lactierender Mäuse gegenüber T. cruzi

α) Fragestellung:

Der Versuch soll einen Beitrag zur Frage einer eventuellen Antikörperübertragung von chagaskranken Mäusen auf die Jungtiere liefern. Es soll festgestellt werden, ob die Jungen solcher Mäuse sich in ihrer Abwehrlage gegenüber T. cruzi anders verhalten als die gesunder Mütter. Trotz einer Reihe von Arbeiten über dieses Problem herrscht noch keine einmütige Antwort.

β) Versuchsanordnung:

Verglichen wird der Krankheitsverlauf von jeweils 16 ((Männchen (m) : Weibchen (w) = 1 : 1)) Jungtieren infizierter lactierender Mäuse aus Versuch h) mit dem von Jungtieren völlig gesunder Mäuse. Es handelte sich bei den Jungen der infizierten Mütter um solche der Gruppe IIa von Versuch h). Die zugegebenen Jungmäuse waren in diesem Versuch gekennzeichnet worden. Verwendet wurden nur von den Mäusen selbst geborene Junge, nicht später zugegebene. Sie wurden den Müttern sechs Tage nach dem Tode des letzten Kontrolltieres (15. Tag) genommen, d. h. nach Beendigung der 3. Lactationswoche. Die Tiere waren also gerade selbständig. Genommen wurden je drei Junge (von einer Maus 4) der Mäuse Nr. 1, 3, 5, 8 und 10 dieser Gruppe; und zwar der Gewichtsklasse 12 - 14 g. Das erklärt die Ein-

schränkung auf 16 Versuchstiere. Die Infektionsdosis wurde wegen der größeren Empfindlichkeit von Jungtieren gegenüber T. cruzi (z.B. KOLODNY, 71,72; CULBERTSON und KESSLER, 21; KAGAN und NORMAN 62; MARCUSE et. al., 99 und viele andere) sehr niedrig gewählt: $30 \cdot 10^3$ Trypanosomen / Maus . - Am 10. Tage p.i. : Parasiten-Zähl-Stichprobe.

γ) Ergebnis

1.) Parasiten-Zähl-Stichprobe am 10. Tage p.i.:

Junge infizierter Mäuse: 11968 ± 2144 Tryp./mm^3 Blut

" gesunder " : 12608 ± 2022 " /mm^3 Blut

In graphischer Veranschaulichung:

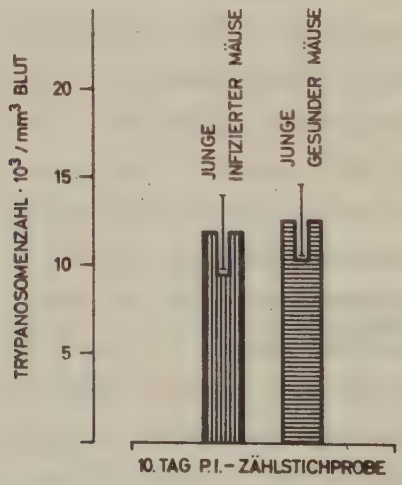


ABB. 19

Graphische Darstellung der Parasitenzahlen /mm^3 Blut von Jungen infizierter und gesunder Mäuse.

Wie die eingezeichneten mittleren Fehler zeigen, können die Trypanosomenmengen am 10. Tage nach der Infektion nicht als unterschiedlich angesehen werden.

2.) Lebenstage p.i.:

Tier Nr.	LEBENSTAGE der JUNGEN p.i.		
	Geschlecht	Junge infizierter Mäuse x_i	Junge gesunder Mäuse y_i
1	m	18	20
2	w	19	21
3	m	18	14
4	w	18	14
5	m	19	16
6	.	15	15
7	.	21	12
8	.	15	16
9	.	17	20
10	.	14	15
11	.	17	17
12	.	21	21
13	.	20	21
14	.	17	16
15	m	17	18
16	w	14	16
n=16	m:w = 1:1	$\bar{x}$ =17,50	$\bar{y}$ =17,00
		s = 2,22	s = 2,85
		$s_{\bar{x}}$ = 0,55	$s_{\bar{y}}$ = 0,71

TAB. 16:

Lebenstage p.i. von Jungen infizierter und gesunder Mäuse (Inf. Dosis : $30 \cdot 10^3$ Tryp. / Maus)

Der t - Test ergibt:

$t_f = 0{,}55$;

$f = 30$;

$p > 0{,}05$;

Die Differenz der beiden Mittelwerte ist also ungesichert.

Die Vermutung, daß Junge T. cruzi-infizierter Mäuse vor der Krankheit besser geschützt sein könnten als Junge gesunder Mütter, muß unter den dargestellten Versuchsbedingungen zurückgewiesen werden.

B) Einige kausalanalytische Versuche zur T. cruzi - Infektion in der Lactation

Die Ursache niederer Parasitämie sowie längerer Lebenszeit nach der Infektion bzw. gar des Überlebens lactierender Mäuse im Vergleich zu normalen ist unbekannt. Die im folgenden geschilderten Versuche sollten der Prüfung etlicher denkbarer Hypothesen zur Erklärung der eigentümlichen Phänomene dienen.

a) Die Frage einer immunbiologischen Ursache

α) Fragestellung:

Versuchsziel war, zur Klärung der Frage beizutragen, ob eine vermehrte A n t i Körperbildung lactierender Mäuse gegen T. cruzi als mögliche Ursache in Betracht

kommt. Allgemein ist die Bildung von Anti - Körpern einer der Abwehrmechanismen gegen Protozoeninfektionen. (MAEKELT, 98). Zur Beantwortung der Frage wurde ein N e u t r a l i s a t i o n s t e s t herangezogen. Es handelt sich um einen sehr empfindlichen Tierversuch. Von Interesse ist zunächst nur ein qualitatives Ergebnis, ob also überhaupt immunologische Vorgänge eine Rolle spielen. - Ausgangsmodell des Versuches war eine von CUNNINGHAM und VAN HOEVE (22) entwickelte Neutralisationsreaktion für afrikanische Trypanosomen. Sie mußte aber abgewandelt werden.

Versuchsanordnung:

1.) Zunächst wurde eine Gruppe von jeweils 10 lactierenden (unmittelbar nach der Geburt - binnen 24 h danach) und 10 normalen Mäusen infiziert. Jungenzahl / Maus: const. = 10. Parasitendosis $1{,}3 \cdot 10^6$ Organismen / Maus. Am 8. Tage p.i. fand eine P a r a s i t e n z ä h l u n g statt.

2.) Aus den beiden Gruppen (Lactierende = Gruppe I; Kontrollen = Gruppe II) wurden nach der Zählstichprobe (8. Tag p.i.) jeweils drei Mäuse mit annähernd gleichen Parasitenzahlen / mm^3 Blut ausgesondert, um eine bessere Vergleichsgrundlage zu gewähren. Und zwar:

Gruppe I = infizierte Lactierende:

Maus a_I : 10880 Tryp./mm^3 Blut

" b_I : 8320 Tryp./mm^3 Blut

" c_I : 10240 Tryp./mm^3 Blut

$\bar{x}$ = 9813 Tryp./mm^3 Blut

Gruppe II = infizierte Normalmäuse:

Maus a_{II} : 66560 Tryp./mm^3 Blut

" b_{II} : 73600 Tryp./mm^3 Blut

" c_{II} : 69760 Tryp./mm^3 Blut

$\bar{y}$ = 69760 Tryp./mm^3 Blut

Die Trypanosomenzahlen der beiden Gruppen unterscheiden sich also um mehr als das Siebenfache:

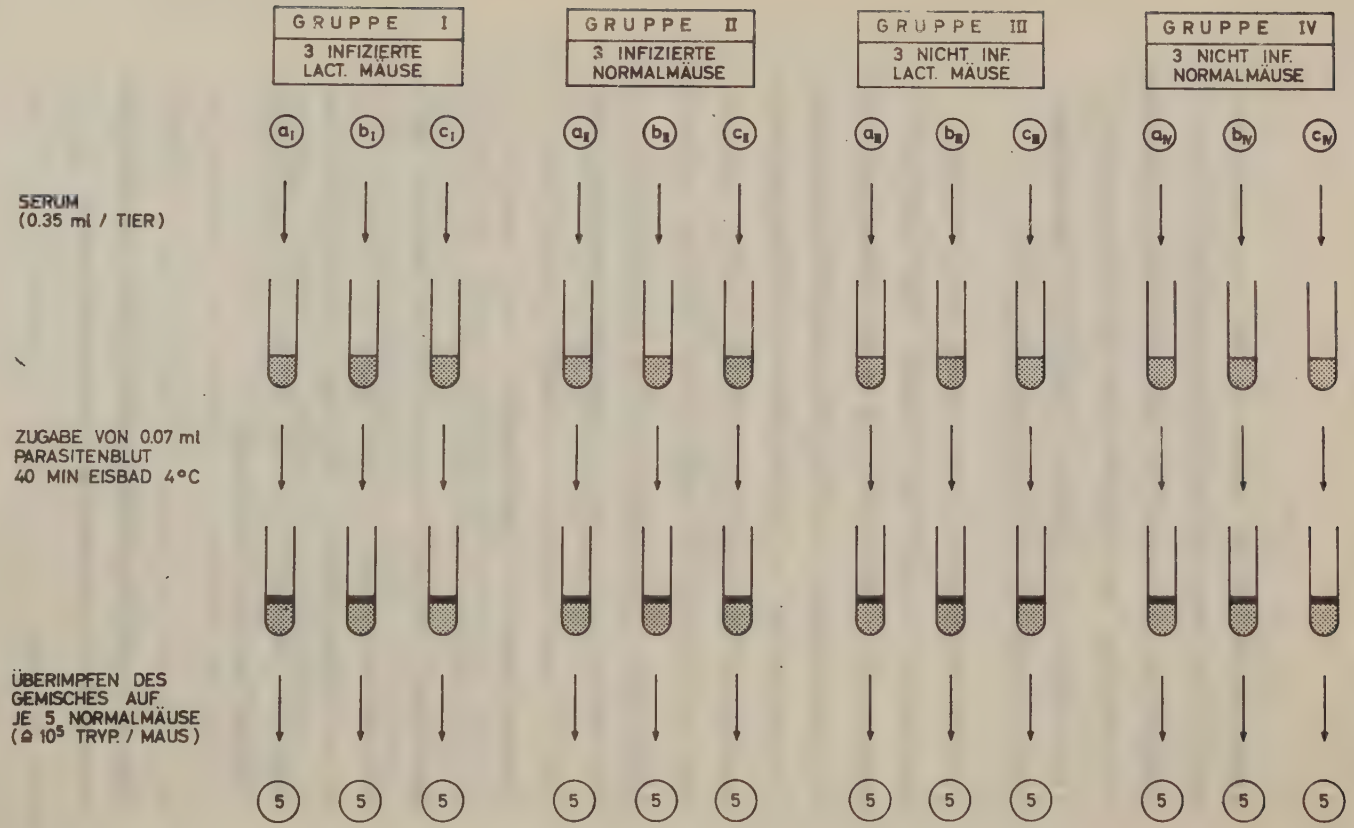
$$\bar{y} \approx 7\bar{x}.$$

Zum Vergleich wurden weiterhin Seren von 3 n i c h t infizierten g e s u n d e n l a c t i e r e n d e n Mäusen (= Gruppe III; 10 Junge; Geburt am Tage der Geburt von Gr. I) sowie Seren g e s u n d e r N o r m a l m ä u s e (Gruppe IV) herangezogen.
Beim Entbluten sehr geringe Benetzung der Kapillaren mit Heparin. (Blutgerinnung war noch möglich).
Serumgewinnung durch Zentrifugieren des Blutes ($2 \cdot 10^3$ Umdrehungen / min.; Zentrifugen - Durchmesser 7,0 cm) 30 min. lang.
Die in den 12 Proben g e r i n g s t e gewonnene Serum-

menge betrug 0,35 ml. Deshalb wurden von jeder Maus nur 0,35 ml Serum aus dem Zentrifugenglas in ein Reagenzglas verbracht. Bei mikroskopischer Betrachtung erwiesen sich die abpipettierten Seren als parasitenfrei, während der Bodensatz massenweise angereichert die noch beweglichen Trypanosomen enthielt.

3.) Die unverdünnten Seren wurden mit 0,07 ml Parasitenblut ($= \frac{1}{7}$) pro Gläschen (mit 0,007 ml Heparin/cm^3) inkubiert. D.h. unter Vernachlässigung der Heparinmenge : 0,42 ml Serum-Parasitenblutgemisch (heparinhaltig). Die Röhrchen mit dem Gemisch wurden umgehend 40 min lang in ein Eisbad ($+4^{o}C$) gestellt und anschließend der Inhalt jedes Röhrchens in 5 weibliche Mäuse (Nulliparae, 33-35 g) verimpft (i.m.). Und zwar pro Maus 0,07 ml Serum-Parasitengemisch mit $100 \cdot 10^3$ Trypanosomen. Das entspricht einer Dosis an der unteren Grenze der Infektiosität (vgl. Vers. III g !), um eine möglichst große Empfindlichkeit des Testes zu erreichen. Antigen im Überschuß würde eventuell gebildete geringe Mengen von Antikörpern neutralisieren und so der Nachweisbarkeit entziehen. Außerdem könnte man erwarten, daß exzessive Antigendosen die Phagocytoseleistung des RES blockieren.

Abb. 20 (auf der nächsten Seite) soll den Ablauf von Versuch III Ba schematisch veranschaulichen:


GRUPPE I
3 INFIZIERTE LACT. MÄUSE
GRUPPE II
3 INFIZIERTE NORMALMÄUSE
GRUPPE III
3 NICHT INF. LACT. MÄUSE
GRUPPE IV
3 NICHT INF. NORMALMÄUSE
a_I b_I c_I
a_{II} b_{II} c_{II}
a_{III} b_{III} c_{III}
a_{IV} b_{IV} c_{IV}
SERUM (0.35 ml / TIER)
ZUGABE VON 0.07 ml PARASITENBLUT 40 MIN EISBAD 4°C
ÜBERIMPFEN DES GEMISCHES AUF JE 5 NORMALMÄUSE (≙ 10^5 TRYP. / MAUS)
5

γ) Ergebnis:

Tier Nr.	LEBENSTAGE P.I.			
	I	II	III	IV
1	15	17	13	14
2	14	14	16	12
3	11	15	15	16
4	11	16	14	17
5	13	13	12	überl.
6	18	14	12	13
7	16	13	14	14
8	überl.	16	12	14
9	15	13	11	13
10	13	14	15	14
11	13	14	überl.	13
12	15	16	18	17
13	14	14	12	16
14	12	15	16	14
15	11	16	13	13
n=15	$\bar{x}_I$=13,64	$\bar{x}_{II}$=14,66	$\bar{x}_{III}$=13,78	$\bar{x}_{IV}$=14,27

TAB. 17

Lebenstage p.i. der mit dem aus Abb. 20 ersichtlichen Parasiten-Blut-Serum-Gemisch (I bis IV) infizierten Mäuse.

Die Gruppenwerte werden nach dem F - Test analysiert:

Ursprung der Variabilität	Summe der Abweichungs-quadrate	Zahl der Freiheits-grade	Varianz	Varianz-verhältn.
Zwischen den Grup-pen	9,47	3	3,157	F = 3,15 / 3,09 = 1,021
Innerhalb der Grup-pen	163,9	53	3,092	

Das berechnete F zeigt mit dem bei 5% Überschreitungswahrscheinlichkeit signifikanten Wert (2,78), daß kein Unterschied nachgewiesen werden kann. Die mittleren Lebenszeiten der Gruppen sind einheitlich. Nach diesem Ergebnis kann unter den Bedingungen des Versuches eine etwa vorhandene vermehrte Antikörperbildung lactierender Muse das Verhalten dieser Tiere nicht erklären.

b) Hormonversuch mit Prolactin

α) Fragestellung:

Im lactogenen Hormonkomplex gilt Prolactin als die dominierende Wirk - Komponente. Versuchsziel war, eine Groborientierung zu verschaffen, ob Prolactin (o v i n e s Pr.) einen erfaßbaren Einfluß auf den Verlauf der Chagaskrankheit der Maus ausübt, ob dieses Proteohormon zur Erklärung der in der Lactationszeit gemachten

Beobachtungen beitragen könnte. -

β) Versuchsanordnung:

In den Versuch wurden fünf Gruppen zu nur je 7 Tieren gezogen, da die Mäuse täglich gezählt wurden. Die Tabelle zeigt das Verabreichungsmuster des Hormons:

	2 I.E. Prolactin/Tag		20 I.E. Prolactin/Tag		NaCl
Gruppe	I	II	III	IV	V
2 Tage vor der Infektion	+		+		+
Am Inf.-Tag		+		+	

Tab. 18

Tabellarische Darstellung der Anordnung von Versuch IIIBb.

Das Prolactin wurde laut Vorschrift mit Aqua steril. verdünnt. Prolactingabe täglich zur selben Zeit. Inokulationsvolumen : 0,1 ml i.m. - Parasitendosis : $1{,}3 \cdot 10^6$ Cryp./Maus (Injektion auf der kontralateralen Seite i.m.)

γ) **Ergebnis:**

1.) **Verlauf der Parasitämie:**

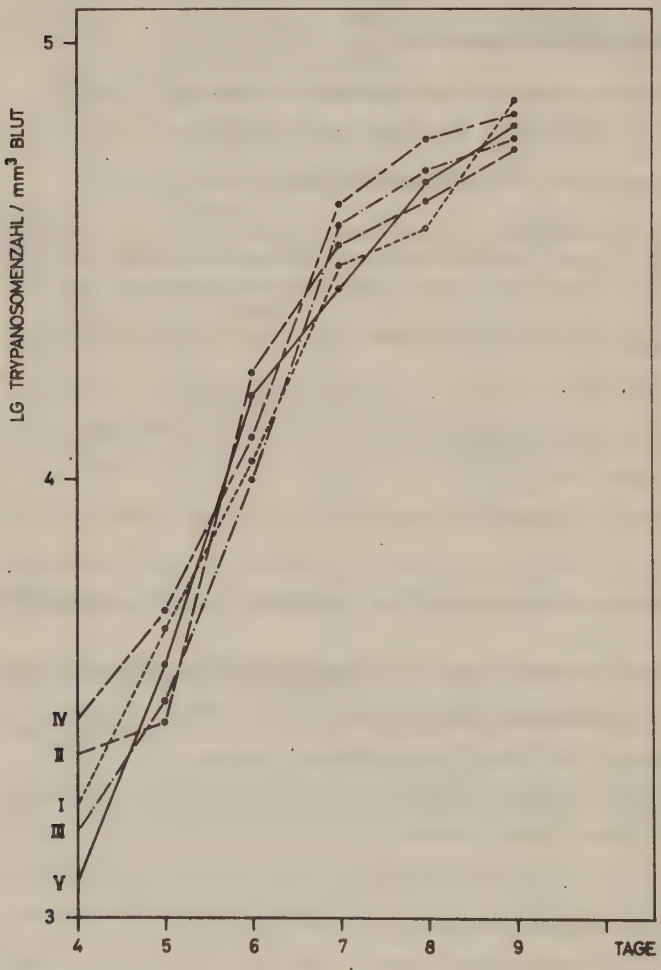


ABB. 21

Die Kurven zeigen den Parasitämieverlauf der täglich mit Prolactin behandelten Mäuse(I bis IV; Kontrolltiere: NaCl≙V).

Die aus Übersichtlichkeitsgründen nicht eingezeichneten mittleren Fehler überschneiden sich. Es besteht also in den fünf Gruppen ein statistisch einheitlicher Parasitämieverlauf.

2.) Lebenstage p.i.

Tier Nr.	LEBENSTAGE P.I.				
	I	II	III	IV	V
1	9	10	10	11	11
2	10	10	12	10	10
3	10	11	10	12	11
4	10	10	11	10	10
5	10	10	12	12	12
6	10	10	10	11	10
7	11	9	11	10	10
n=7	$\bar{x}_I$=10,00	$\bar{x}_{II}$=10,00	$\bar{x}_{III}$=10,86	$\bar{x}_{IV}$=10,87	$\bar{x}_V$=10,57

TAB. 19

Lebenstage p.i. der in verschiedener Weise mit Prolactin (siehe Tab. 18) und NaCl (Kontrollmäuse) behandelten Tiere.

Die Varianzanalyse ergibt:

Ursprung der Variabilität	Summe der Abweichungsquadrate	Zahl der Freiheitsgrade	Varianz	Varianzverh.
Zwischen den Gruppen	5,0	4	1,25	$F = \frac{1,25}{0,59} =$
Innerhalb der Gruppen	17,7	30	0,59	= 2,12

Das berechnete F zeigt bei Vergleich mit dem bei 5% Überschreitungswahrscheinlichkeit signifikanten Wert, daß kein Unterschied nachgewiesen werden kann. Es verhalten sich also mit Prolactin behandelte Mäuse in Bezug auf ihren Todestag nach der Infektion wie die Kontrolltiere. Zumindest nach den Bedingungen dieses Versuches spricht nichts für die Beteiligung von Prolactin am Zustandekommen der verzögerten Trypanosomenentwicklung in der Lactationszeit.

c) Meritive Einflüsse

α) Fragestellung:

Eine große Zahl von Autoren hat sich mit der Substanzverarmung des mütterlichen Organismus in der Schwangerschaft bzw. Lactationszeit beschäftigt. Es wäre denkbar, daß das Standardfutter keine ausreichenden Entwicklungsmöglichkeiten für Saugmäuse und Parasiten zugleich gewährleistet. Auch diese Vorstellung könnte

formal viele der gefundenen Erscheinungen erklären. Deshalb wurde den Mäusen ein selbstentwickeltes Futter (Futter A) verabreicht, dessen hervorstechendstes Merkmal ein außerordentlich hoher Fett- und Eiweißgehalt ist. Zudem interessierte, ob das J u n g e - f r e s s e n , wie es in der Lactationszeit T. cruzi infizierter Mäuse stets verstärkt zu beobachten ist, durch andersartiges Futter beeinflußt werden könne. Ein Kontrollversuch wurde mit gleichen Zahlen n i c h t infizierter Tiere angesetzt, zumal gelegentlich behauptet wird, Eiweißmangel sei die Ursache dieses Verhaltens(vgl. H[illegible], 41) bei gesunden Mäusen. Unter "Fressen" der Jungen sei deren Tötung durch die Muttertiere zumindest unter Hinterlassung von Bißverletzungen verstanden. Meist handelte es sich aber um teilweisen oder vollständigen Verzehr der Saugmäuse. Der Versuch wird nur seines auffälligen Ergebnisses wegen geschildert. An sich spricht ja das Ergebnis von Versuch III A d (Entfernung der Jungen unmittelbar nach der Geburt) gegen die dem Versuch ursprünglich unterlegte Annahme. Dieses Experiment war aber zeitlich nach dem Futterversuch durchgeführt worden.

β) Versuchsanordnung:

Als Futter diente das Futter A, als Nahrung der Kontrolltiere Futter B (Murilan). Gabe der beiden

Diäten ab acht Tage vor der Geburt. Infektion der Mäuse: unmittelbar nach der Geburt mit $1{,}0 \cdot 10^6$ Tryp./Maus. Diese um $0{,}3 \cdot 10^6$ niedrigere Dosis als sonst wegen des unerwartet frühzeitigen Todes zweier Spendertiere. Die erreichbare Parasitenmenge war kleiner als sonst.- Am 6. Tage p.i. Parasiten-Zählstichprobe.- Die zwei überlebenden Tiere wurden nach drei Monaten p.i. einer X e n o d i a g n o s e mit Wanzen unterzogen. - Täglich wurde eine Kontrolle auf von den Muttertieren getötete Junge durchgeführt. - Zugegebene Junge wurden mit Farbe gekennzeichnet. Die Mäuse machten zwischen zugegebenen und eigenen Jungen keinerlei Unterschied.

7) Ergebnis:

.) Parasitenzählstichprobe am 6. Tage p.i.

Lactierende-Futter A (Lactierende$_A$) :4608±970 Tryp./mm^{3}Blut
" " B (Lactierende$_B$) :7040±735 " / " "
Kontrolltiere-Futter (Kontrollen$_A$) :17280±1300" / " "
" " B(Kontrollen$_B$) :17946±1005" / " "

Graphisch dargestellt:

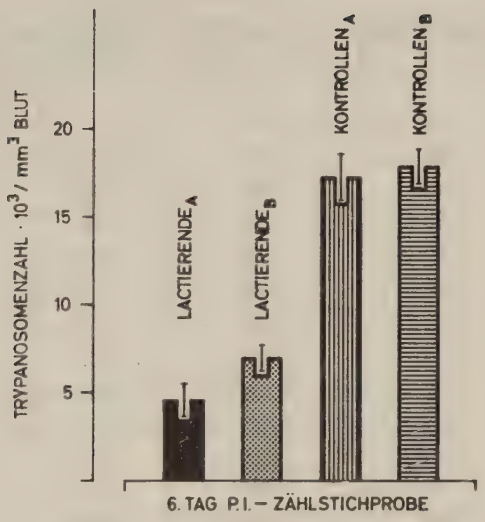


ABB. 22

Trypanosomenmenge/ mm^3 Blut am 6. Tage p.i. bei lactierenden Mäusen und Kontrolltieren. Die Mäuse wurden mit dem entwickelten "Futter A" und Standardfutter ("Futter B") ernährt.

Wie die mittleren Fehler zeigen, besteht wieder eine deutliche Differenz der Parasitenwerte zwischen lactierenden Mäusen und Kontrollen, während sich die Lactierenden bezüglich ihrer Trypanosomenzahlen wahrscheinlich unterscheiden, während bei den Kontrollen kein Unterschied nachgewiesen werden kann.

2.) Lebenszeit p.i.

Tier Nr.	LEBENSTAGE P.I.			
	Lactierende A	Lactierende B	Kontrollen A	Kontrollen B
1	17	16	11	10
2	17	15	11	11
3	15	12	10	11
4	14	14	12	8
5	19	15	11	12
6	18	13	9	9
7	19	15	12	12
8	16	14	11	12
9	18	14	12	11
10	13	14	12	11
11	überl.	16	11	11
12	19	15	10	9
13	18	überl.	10	11
14	16	12	10	12
15	17	14	12	10
n=15	$\bar{x}_A$=16,86	$\bar{x}_B$=14,21	$\bar{x}'_A$= 10,93	$\bar{x}'_B$=10,66
	s = 1,87	s= 1,25	s = 0,96	s = 1,23
	$s_{\bar{x}}$ = 0,50	$s_{\bar{x}}$ = 0,33	$s_{\bar{x}}$ = 0,25	$s_{\bar{x}}$ = 0,32

TAB. 20

Die Tabelle zeigt die Lebenstage p.i. der mit dem entwickelten "Futter A" und Standardfutter ("Futter B") ernährten Mäuse.

Die statistische Auswertung ergibt:

Ursprung der Variabilität	Summe der Abweichungs-quadrate	Zahl der Freiheits-grade	Varianz	Varianz-verhältn.
Zwischen den Gruppen	374,21	3	124,74	$F=\frac{124,74}{1,49}=$
Innerhalb der Gruppen	80,36	54	1,49	$=83,83$

Die F - Tafel zeigt, daß sich die Mittelwerte der vier Gruppen hochsignifikant voneinander unterscheiden. - Zur näheren Analyse wird wieder der t - Test herangezogen. - Dabei ergibt sich für die beiden Lose der L a c t i e r e n d e n:

t_f (A / B - Lact.) = 4,15 ;

(f = 2[illegible]) ;

p < 0,001 ;

Somit wirkt das selbst zusammengesetzte "Futter A" mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1‰ für lactierende Mäuse lebensverlängernd.

Und die K o n t r o l l t i e r e :

t_f (A / B - Kontrollen) = 0,67 ;

(f = 28) ;

p > 0,05

Danach hat das Futter A auf die Lebensl nge von Normalmäusen nach der Infektion keinen Einfluß.

3.) Xenodiagnose

Die beiden überlebenden Mäuse dieses Versuches wurden nach 3 Monaten einer Xenodiagnose nach BRUMPT (16) unterzogen. Sie verlief negativ.

4.) Das Fressen von Jungen durch kranke und gesunde Mütter.

Am übersic tlichsten läßt sich das Ergebnis der Beobachtungen in einer Graphik darstellen:

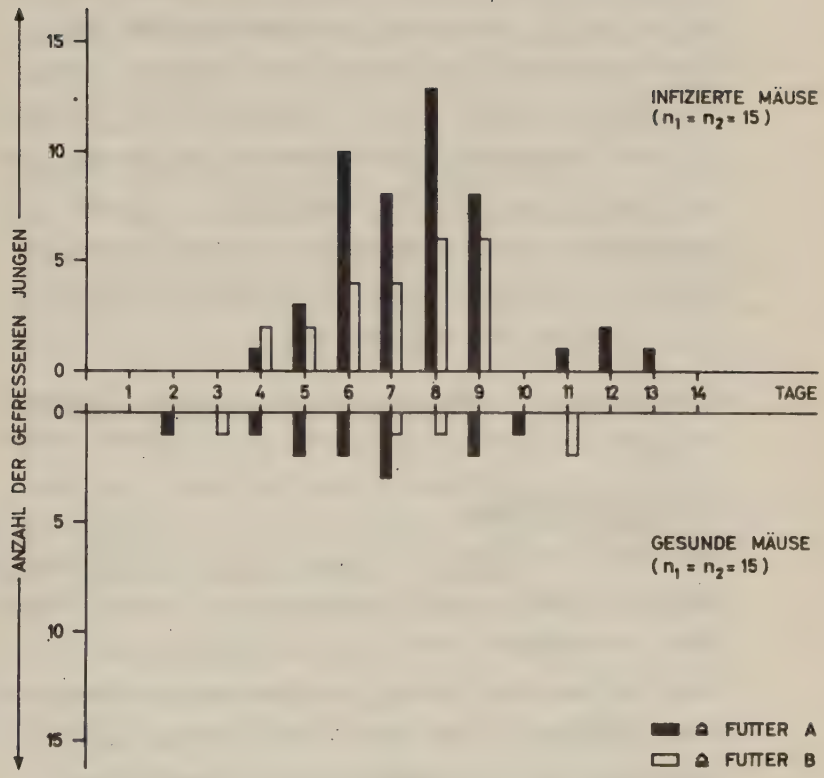


ABB. 23

Anzahl der von infizierten und gesunden Mäusen mit Futter A und Futter B gefressenen Jungen in Abhängigkeit von der Zeit.

Da es 1.) in vier Fällen der infizierten Mäuse nicht klar war, ob die Jungen getötet wurden oder gestorben sind und 2.) am Ende der Parasitämie keine ganz sichere

Unterscheidung zwischen gestorbenen und gefressenen Jungen möglich erscheint, wird ausnahmsweise auf eine statistische Interpretation verzichtet. - Es scheint aber auf der Hand zu liegen, daß das "Futter A" zu stark vermehrtem Jungefressen bei infizierten, zu gesteigertem bei gesunden Mäusen führt. - In den prämortalen Tagen werden so gut wie keine Junge mehr gefressen. Hier setzt aber das ursächlich noch ungeklärte Sterben der Saugmäuse ein.

d) Differential - Blutbilder verschiedener Mäusegruppen

α) Fragestellung:

Ohne bestimmte Zielvorstellung wurden aus verschiedenen infizierten und nicht infizierten Mäusegruppen kleine Tier - Stichproben entnommen, um festzustellen, ob sich etwa aus dem Blutbild irgendwelche Erklärungshinweise ableiten ließen. Besonderes Interesse galt den Monocyten, die als Makrophagen des weißen Systems bei der Abwehr größerer Mikroorganismen, wie es Protozoen sind, eine hervorragende Rolle spielen. (Nähere Angaben finden sich bei MAEKELT, 98, und MAUCK, 120).

β) "Versuchs" - Anordnung

Aus Gruppen von jeweils 10 Mäusen wurden je 3 Mäuse ausgewählt (aus Versuch III B a - zur Frage einer immunbiologischen Ursache) , und zwar von den infi-

zierten Tieren, die mit den ähnlichsten Trypanosomenwerten (Mäuse $a_I - c_I$ und $a_{II} - c_{II}$ von Vers. IIIa), wobei sich je die Parasitenzahlen /mm^3 Blut um etwa das Siebenfache unterschieden. – Parasitendosis : 1,3·10^5 Organismen / Maus. Schlachtprobe am 5. Tage p.i. – Die g e s u n d e n Kontrolltiere – lactierende und normale Mäuse gleichen Alters und Gewichts – wurden wieder mit Hilfe zufällig angeordneter Zahlen aus größeren Tiermengen ausgelesen. – Um einen besseren Genauigkeitsgrad zu erreichen, wurden jeweils 200 Leukocyten differenziert. Das Ergebnis zeigt die folgende Tabelle. Es sind die Mittelwerte der Tiere angeführt. Auf eine statistische Auswertung wurde natürlich wegen der geringen Zahl der Fälle verzichtet.

Ergebnis:

Tiergruppe		Infiz.Lactierende			Infiz.Kontrollt.		
Tryp.Zahl $\cdot 10^3/mm^3$ Blut (8. Tag p.i.)		8,3	10,2	10,9	66,6	69,8	73,6
Leu-	Stabförmige	1,5	0,5	5,5	9	3,5	3
co-	Segmentkernige	86	95	74,5	59	76	84
cy-	Lymphocyten	9,5	4	12	26	13,5	10,5
ten	Eosinophile	0	0	0	0	0	0
%	Monocyten	3	0,5	8	6	7	2,5

Tiergruppe		Gesunde Lact.			Gesunde Kontr.		
Tryp.Zahl $\cdot 10^3/mm^3$ Blut (8. Tag p.i.)		ø	ø	ø	ø	ø	ø
Leu-	Stabförmige	1	1,5	3	3,5	2	0,5
co-	Segmentkernige	47	58	57,5	47	25,5	22
cy-	Lymphocyten	46	35,5	37	41	68	74
ten	Eosinophile	1	0	0	0,5	0	0
%	Monocyten	5	4,5	2	8	4,5	3,5

TAB. 21

Differentialblutbildwerte von jeweils drei Mäusen der oben bezeichneten Tiergruppen.

aus den Blutbildwerten, die gut mit bekannten Tatsachen in Einklang stehen, kann kein besonderer Befund erhoben werden.

IV.) DISKUSSION

Soweit es erforderlich erscheint, werden die beiden vorausgehenden Hauptteile der Arbeit diskutiert.

A) Material und Methoden

In welchem Maße die gewonnenen Versuchsergebnisse auch für andere Mäuse - oder T. cruzi - Stämme, bzw. andere Säugetierarten oder gar den Menschen, evtl. auch für andere Blutflagellaten gelten, bleibt abzuwarten. Das ist vorläufig eine Begrenzung der Aussage. Die Arbeit war streng an weibliche Mäuse des Stammes NMRI Tübingen unter bestimmten Forderungen sowie Trypanosomen des WBH - Stammes gebunden. Die Einengung ist deshalb besonders nötig, da nicht nur die T. cruzi - Stämme Verhaltensunterschiede zeigen, sondern sich nach Untersuchungen von PIZZI et al. (129 a) die genetische Konstitution der Versuchstiere auf den Infektionsverlauf von T. cruzi erheblich auswirkt. Die im allgemeinen aber recht geringe Streuung der quantitativen Daten spricht in Hinblick auf die durchgeführten Versuche für die Tauglichkeit dieses Koloniestammes. Dennoch könnten Arbeiten mit Inzuchtstämmen oder sogar gnotobiotischen Tieren (144) von Interesse sein. Von größerem freilich analoge Reproduktionsversuche mit anderen Laboratoriumstierarten. - Selbstredend sind Graviditität und Lactation an weibliche Mäuse gebunden, wohl könnten aber auch als

Kontrolltiere Männchen herangezogen werden. Während HAUSCHKA (44) bezüglich der T. cruzi - Parasitämie in der Maus Geschlechtsunterschiede fand, wird die Behauptung zunehmend bestritten (MENEZES, 111;bei T. brucei neuerdings auch LUMSDEN et al. 92)
Sehr großer Wert wurde auf die standardisierte H a l t u n g der Tiere gelegt. In der Literatur finden sich nicht viele Angaben über den Einfluß der Tierhaltung auf die Versuchsergebnisse. So wird durch die Besetzungsdichte (BACKMA, 7) nicht nur die Gewichtszunahme von Mäusen beeinflußt, sondern sogar die Spontantumorrate (ANDERVONT, 2; ALBERT 1). In Hinblick auf parasitäre Erkrankungen erscheint eine Arbeit von HAAKH und KRETSCHMAR,(80), was Umweltseinflüsse und Lactation angeht, die von GROSVENOR et al. (37) nennenswert.
Über den Trypanosomenstamm ist zu sagen, daß besonders Ergebnisse von HAUSCHKA (46) und PHILLIPS (126), die sich ebenfalls mit dem WBH - Stamm beschäftigt haben, weitgehend bestätigt werden konnten.
Als Vorteil gegenüber den üblichen Verfahren wird die entwickelte Methode der Berechnung einer beliebigen Trypanosomenzahl für ein beliebiges Inokulationsvolumen nach dem Prinzip des "i n v e r s e n D r e i s a t z e s" angesehen. Das Verfahren eignet sich natürlich u. a. auch für andere Blutparasiten. Der üb-

lichen Methode liegt das Prinzip der logarithmischen Verdünnung zugrunde. Der Nachteil liegt aber darin, daß es Schwierigkeiten bereitet, variabel genau bekannte Trypanosomenzahlen in einem ebenso variablen Volumen zu erzielen. Zudem erscheinen Zehnerpotenz-Abstände zur Gewinnung verläßlicher Dosis-Wirkungs-Funktionen als wesentlich zu groß. Zugegeben sei, daß besonders dieses Problem durch Reihen geometrischer Progression beherrschbar ist. Die Methode von KOLLE (70) berücksichtigt nicht das Volumen. - Der angegebene Berechnungsvorschlag ist allerdings an hochparasitämische Tiere gebunden. Dazu eignen sich aber praktisch die Großzahl der Tiere im präMortalen Zustand, wie das Ergebnis der Berechnung III A j (prämortale Trypanosomenzahlen) zeigt. Da die Anwendung der vorgeschlagenen Formel sehr exakte Parasitenzahlen liefert, erscheint sie als das Verfahren der Wahl. Reproduzierbarkeit ist optimal gewährleistet.

Die hohe Dosis von $1{,}3 \cdot 10^6$ Tryp./ Maus wurde gewählt, weil für viele der Versuche die Anwendung einer niedrigeren Dosis keinen größeren Informationswert erwarten ließ. Diese Dosis bringt aber wegen der Verkürzung der Krankheitsdauer den erheblichen Vorteil der Zeitersparnis. Die Versuchsergebnisse haben die Berechtigung der Entscheidung für diese Dosis bestätigt.

Bemerkenswert ist ein Ergebnis von PHILLIPS (126). Er stellte fest, daß Inokula eines konstanten Volumens, aber zunehmend weniger Parasiten enthaltend, bei intraperitonealer Verabreichung zu einer Verminderung der Pathogenität führen. Diese Verringerung der Pathogenität findet sich aber nicht in dem Maße, wenn man das Volumen der Inocula einer konstanten Parasitenzahl anpaßt. Für die Experimente dieser Arbeit wurde das erste System herangezogen und beibehalten. Da PHILLIPS keine Erklärung für seinen Befund, den wir bei der Infektion von Spendermäusen bestätigen konnten, gibt, soll eine naheliegende Auslegungsmöglichkeit an Hand eines Schemas vorgeschlagen werden.

Das Peritonaeum ist ein bedeutender Ort immunbiologischer Abwehr (vgl. [illegible]AX et al.,5; LUM[illegible] und [illegible], 93; ferner auch [illegible], 33 und [illegible], 1[illegible]0). Der Gedanke liegt nahe, daß bei konstanter Parasitenblutkonzentration das lokale Phagocytosesystem belasteter oder gar überlastet wird, somit der Krankheitsverlauf schwerer ist.

Schematisch:

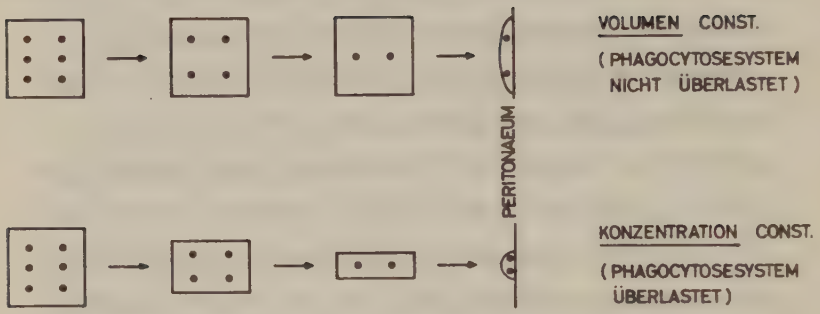


ABB. 24

Schema zum Versuch einer Erklärung der verschiedenen Wirkung von mit konstantem Volumen und konstanter Konzentration des Parasiten-Inokulums infizierten Tieren. Die Trypanosomenzahl ist in beiden Fällen gleich.

Die nur einmal bei überlebenden Mäusen - Versuch IIIBc - angewandte Methode der X e n o d i a g n o s e nach BRUMPT (16) - könnte vielleicht durch die modifizierte Methode nach MIEKELT (97) verfeinert werden. Jedenfalls erscheint es fragwürdig, ob überlebende, lactierte habende Mäuse trotz negativer Xenodiagnose nach BRUMPT wirklich trypanosomenfrei sind. Die Parasiten können sich im Wirt sehr lange verborgen halten. Besonderes Aufsehen erregte z. B. die positive Xenodiagnose jener Frau (MAGALDO et al., 137), bei der Carlos Chagas im Jahre 1909 - das Mädchen war damals zwei Jahre alt - das T. cruzi zum ersten Male im Blut des Menschen sah.- BRUMER (14) umriß die langwierigen diagnostischen Wege, die erforderlich sind, einen Residualbefall in einem Nagetier auszuschließen.

Was die Z ä h l u n g der Parasiten betrifft, die äußerst mühsam und zeitraubend ist, so wäre zu prüfen, ob sich dazu nicht elektronische Zählverfahren ausarbeiten liessen, wie sie heute zur Erythrocytenzahlbestimmung herangezogen werden. Auch Messungen der optischen Dichte wie sie LAMB LOHT (82) bei T. cruzi anwandte, könnten die Zählung beschleunigen. Denn nur auf genügend breiter statistischer Basis lassen sich die faszinierenden Wirt - Parasit - Beziehungen zufriedenstellend erfassen.

B) Diskussion der Ergebnisse

a) Versuche formaler Art

Obwohl die Arbeit von der Entdeckung von KRAMPIS (76) ausging, daß nämlich das Trypanosoma duttoni in der Trächtigkeit der Hausmaus eine erhebliche Vermehrung erfährt, wurde dieser äußerst interessante Aspekt im weiteren Verlauf der Experimente nicht mehr beachtet.- Auch für das T. cruzi wirkt die Graviditat der Maus stark vermehrungsfördernd. Es liegt deshalb nahe, an eine Beziehung zu den häufig beschriebenen congenitalen T. cruzi - Infektionen zu denken. Sie sind im Zusammenhang von ART (3) dargestellt worden, während Experimente zur causalen Klärung besonders von [illegible] und KUHERT (153) angestellt wurden. Unseres Wissens wurde der letzte Fall im Jahre 1966 durch PLAIFOSSE et al. (130) geschildert.

Merkwürdigerweise starben die gravide gewesenen Mäuse zur selben Zeit wie die Kontrolltiere, obwohl ihre präterminale Trypanosomenzahl nahezu sechsmal so hoch lag. Es ist denkbar, daß in der Zeit nach der Geburt - allerdings knickt die Kurve nicht ab - Phänomene der Trächtigkeit mit solchen der Lactation interferieren. Der Parasitämieverlauf der Mäuse mit den Totgeburten stand in gutem statistischem Einklang mit dem der anderen Mäuse. Die totgeborenen Jungen entsprachen bei

der Geburt in ihrem Reifegrad den lebenden Jungen. Sie sind damit kurz vor der Geburt zugrund gegangen. Es veränderten also nicht etwa intrauterine tote Tiere den Verlauf der Parasitämie. - Die Infektion der trächtigen Mäuse erfolgte analog dem Versuch von KRAUPP (76) am 13. Graviditätstag. Das verspricht bei T. duttoni den optimalen Erfolg, da die Vermehrungsförderung klar an die Zeit der Ausbildung des Trophoblasten gebunden ist. Dennoch könnten Experimente mit Mäusen in einer früheren Trächtigkeitsphase wertvoll sein. Freilich wäre das auf ausreichender statistischer Grundlage mit nicht geringen Schwierigkeiten verbunden: 1.) Uns gelang oft nur in der Hälfte der Fälle ein sicherer Deckerfolg der Mäuseweibchen; sichtbar wird der einwandfreie Deckerfolg erst nach 10 Tagen. - 2.) Kaum bewältigbare Mühlarbeit wäre nötig. - 3.) Die Chance intrauterinen Absterbens wäre noch größer. Allerdings wäre an die Wahl kleinerer Parasitendosen zu denken. - Sicher ist jedenfalls, daß den Experimenten verhältnismäßig enge Grenzen gesetzt sind. - Besonders interessant sind wahrscheinlich Untersuchungen mit einem der weitgehend apathogenen T. cruzi - Stämme der südlichen USA (Cura - und Romero - Stamm; vgl. KOFOID und MCNEIL, 63, 64 und GALLIARD et al., 34) . - Für kausalanalytische Versuche ist T. cruzi sicher ungeeignet, da T. duttoni die Erscheinung der exzessiven Vermehrung in der Gravidität noch wesentlich besser zeigt. Zudem

ist dieser Parasit weit größer - insofern besser zählbar - und führt auch nur selten zu Totgeburten der Mäuse.

Trotz einiger Arbeiten über lactierende T. cruzi - infizierte Mäuse - besonders über immunbiologische Fragen- ist die Begünstigung lactierender Mäuse nach der Infektion mit T. cruzi noch niemals beobachtet worden. Allgemein gilt die Lactation als besondere "stress" - Situation: bekannt ist beispielsweise beim Menschen der schwere Verlauf der Tuberculose oder auch des Portio- oder des Mamma - Carcinoms (HAGENSEN, 38) im Wochenbett. Auch von Parasitosen gilt allgemein, daß sie durch "stress" - Lagen gefördert werden.

Die Absicherung längerer Lebenszeit unmittelbar nach der Geburt infizierter Mäuse gegenüber Vergleichstieren beträgt hierbei $p < 0{,}001$. Weiterhin findet sich ein gut gesicherter Unterschied zwischen unmittelbar nach der Geburt und am 10. Lactationstage infizierten Tieren. Dieser Versuch mit am 10. Tage der Lactation infizierten Mäusen sollte ein Ereignis irgendwelcher Art in zeitlich allzu großer Nähe der Geburt als Ursache ausschließen. Andererseits ist die Saugintensität der Jungen ein bedeutender Faktor der Aufrechterhaltung der Lactation. So führt beispielsweise das Saugen auf neuralem Wege zu einer Freisetzung von Prolactin, Oxytocin und auch ADH (MEITES et al., 109), was sogar anhält, wenn die Milchdrüsen an der Entleerung gehindert werden.

Andererseits kann kein Zweifel über die Entleerung als Reiz zu weiterer Sekretion bestehen. Die Lactation aller Säugetiere kann durch Ersatz älterer Junge durch jüngere ganz erheblich verlängert werden. (- die ausführlichste Zusammenfassung diesbezüglich einschlägiger Arbeiten findet sich bei LINZELL, 89). Freilich kann aber der Saugeinfluß die beobachteten Erscheinungen, wie Versuch IIIAd (Entfernung der Jungmäuse) zeigt, nur teilweise erklären. Nach Entfernung der Jungen von den Muttertieren unmittelbar nach der Geburt und unmittelbar vor der Infektion läßt sich im Vergleich mit den Kontrolltieren eine zwar kleinere, aber doch noch sehr deutliche, statistisch gesicherte Differenz feststellen. Also ist die Parasitenvermehrung nach der Geburt in den Muttertieren auch unabhängig vom Saugen der Jungen gehemmt. Keines der kranken Tiere überlebte allerdings, was im Falle des Saugens der Jungen so gut wie stets der Fall war. Die Lebenszeit dieser Mäuse ist verglichen mit der von Mäusen, die ihre Jungen stillten, kürzer. Weiterhin sind die Erscheinungen nur an die Lactationszeit gebunden. Das verdeutlichte die Infektion von Mäusen acht Tage nach Beendigung der Lactationszeit (Versuch III A g).

Zwischen Jungenzahl und Milcherzeugung, zwischen dem nervösen Stimulus des Saugens und der endokrinen Antwort des Hypothalamus - Hypophysensystems besteht eine gesicherte positive Beziehung (EDWARDSON und EAYRS,28).

Sogar eine quantitative Abhängigkeit des Nucleinsäuregehaltes (DNA) und der Protein - Synthese - Aktivität (RNA) lactierender Ratten - Milchdrüsen konnte gefunden werden. (TUCKER, 147). - Durch Versuch III A f wurde mit unterschiedlic en Jungenzahlen, und zwar mit den Extremen 10 Junge und 1 Junges (Kontrolle 0 Junge) der Einfluß der Jungenzahl geprüft. Die Jungenzahl sollte auch bedingt die Auswirkung verschieden alter Junge repräsentieren. Nach dem Ergeb is dieses Experimentes läßt sich zumin st bei de durchgeführten Versuchszahl kein Unterschied sicher n. Eindeutig auffällig ist aber, daß nur die Gruppe mit 10 Jungen ein überlebendes Muttertier enthielt, ferner auch nur diese zwei Mäuse mit überlanger Lebenszeit. Insgesamt wird also doch die Vermutung nahegelegt, daß die Jungenzahl auf die Erkrankung nic t ohne Einfluß ist. - Im übrigen sei erwähnt, daß die in allen Versuchen auf 10 = const. gehaltene Jungenzahl insofern ihre besondere Bedeutung hat, als LEBEDEW-SCH und EVERS (28) gerade bei dieser Zahl das Maximum der Milchproduktion ihrer Versuchstiere fanden.
Alles in allem ist aber anzunehmen, daß die Erklärung für die der Lactation eigenen Parasitämiephänomene mit der Jungenzahl nur verhältnismäßig wenig zu tun haben. Das verschiedene Verhalten von unmittelbar nach der Geburt und am 10. Lactationstag infizierten Mäusen ist wohl am ehesten mit den Veränderungen des mütterlichen Organismus im Laufe der Lactation zu interpretieren.

Weitere Klarheit könnte ein zwar quantitativ nic t sehr, aber sachlich-reproduktiv befriedigender Versuch mit Mäusen schaffen, dessen beide Muttertiergruppen unmittelbar nach dem Geburtstag neugeborene und i. Austausch 10 Tage alte Junge aus anderen Würfen erhalten. Quantitativ wirklic befriedigstellend - wenn überhaupt der Mühe wert - könnten nur exakte Heilversuche der Mäuse sein; etwa nach den Methoden von COX und MUELLER (19), MC DERMOTT et al. (106) oder FELLER (30).

Für ein Experiment mit kleineren Parasitendosen als bisher ($1{,}3 \cdot 10^6$ Tryp./ Maus) war ein Versuch mit gestuften Dosen notwendig. - An quantitativen Untersuchungen zur Ermittlung des Latenz- und Sterbeverhaltens bei verschiedenen Trypanosomeninfektionen hat es nicht gefehlt. Frühe und anregende Untersuchungen mit T. equiperdum, lewisi und brucei sind von KOLLER (70), systematische Dosisversuche mit T. cruzi erst im Jahre 1940 von MAZZOTTI (105) gemacht worden. Doch sind MAZZOTTI's Beobachtungen insofern für Arbeiten mit dem MAH - Stamm von eingeschränktem Wert, als er andere Parasitenstämme verwendete sowie Mäuse undefinierter Herkunft. - 1959 fand BAKER (6) einen proportionalen Zusammenhang zwischen Präapparenzperiode und inokulierter Trypanosomenzahl in logarithmischer Abhängigkeit bei T. brucei und T. rhodesiense in verschiedenen Säugetieren. - Neuere quantitative Arbeiten über

die Sterbezeit T. cruzi - infizierter Mäuse sind von [illegible] et al. (48) sowie [illegible] (100) veröffentlicht worden. [illegible] verwendete einen brasilianischen, [illegible] einen peruanischen Trypanosomenstamm.

Das Ergebnis der vorliegenden Arbeit zeigt, daß auch für die Präpatenzzeit von T. cruzi ein logarithmischer Proportionalitätszusammenhang, und zwar vom Bezugstyp $f(x) = e^{-x}$ gegeben ist. - Ebenso besteht eine solche Relation für die Sterbezeit - allerdings nach dem gefundenen Ergebnis nur im Bereich von $1{,}0 \cdot 10^5$ bis $1{,}0 \cdot 10^6$ inokulierten Trypanosomen. Bei $1{,}0 \cdot 10^4$ inokulierten Parasiten nimmt die Streuung der Einzeldaten sehr zu, so daß der betreffende Mittelwertspunkt nicht mehr auf der Geraden liegt. Dieser Streuungsanstieg dürfte als Ausdruck einer zunehmenden individuellen Auseinandersetzung zwischen Parasiteninvasion und Wirtsabwehr gewertet werden. Eine verläßliche Lage des Kurvenpunktes bzw. der Kurve insgesamt kann aber nur eine umfangreichere Mäusezahl unter den Bedingungen des Versuches liefern. Es war nicht das eigentliche Ziel dieses Experimentes, exakte Dosis - Wirkungsbeziehungen zu finden. Es sollte nur diejenige Parasitenmenge ermittelt werden, bei der gerade mit dem Sterben aller Versuchstiere zu rechnen ist, also die untere Grenze der Infektiosität.

Auf die Erlangung einer m i t t l e r e n t ö d l i c h e n D o s i s wurde verzichtet. Denn die Methode nach SPEARMAN und KÄRBER, die allen anderen näherungsweisen Rechenverfahren vorzuziehen ist und eine größere Schätzgenauigkeit besitzt als andere (GROSS, 15), verlangt die Testung hinreichend großer und kleiner Dosen. Im Versuch fehlte die geforderte Dosis - es soll wenigstens eine sein - mit 0% Reaktionen. - Die ermittelte Dosis, die zum Absterben noch aller Mäuse führt, deckt sich ungefähr mit der von HAUSCHKA (46) bestimmten.

Mit dem Versuch III A h (Infektion lactierender Mäuse mit niedrigeren Parasitendosen als bisher) wurden die Konsequenzen aus dem Versuch III f g (gestufte Parasitendosen) gezogen. Die gewünschte Dosis wurde mit Hilfe des Experimentes III f g tatsächlich auffindig gemacht. Das Ergebnis der Verabreichung kleinerer Parasitendosen auf lactierende Mäuse entsprach der Vermutung. Offensichtlich kommen also bei einer Infektion mit einer niedrigeren Trypanosomendosis als sie in der Mehrzahl der Versuche ($1{,}3 \cdot 10^6$) verwendet wurde, die parasitenvermehrungshemmenden Kräfte der Lactation besser zum Tragen. Der Unterschied zwischen lactierenden Mäusen und Kontrolltieren wurde nun erst überdeutlich sichtbar. Von Interesse könnte noch ein Versuch sein, dessen Ziel es wäre, eine Dosis zu er-

mitteln, bei der - verglichen mit Kontrolltieren - a l l e lactierenden Mäuse überleben. Sicher aber müßte dabei die Lactationszeit durch erneute Zugabe jüngerer Saugmäuse verlängert werden, was sich im übrigen auch schon bei der Infektion am 10. Tage der Lactation empfiehlt.

U.a. sei erwähnt, daß in diesem Versuch mit kleineren Parasitenmengen, so gut wie kein Jungefressen stattfand.

Obwohl es auffällig ist, daß gegenüber Gruppe IIa in Gruppe IIa' zwei Tiere mehr überlebten, kann diese Abweichung nicht als überzufällig angesehen werden.

Für den Befund von KRETSCHMAR und HAAKH (80), daß durch die B e u n r u h i g u n g der Mäuse beim Hantieren (Blutentnahme, Messungen) der Verlauf der Nagetiermalaria (Plasmodium berghei) in der Laboratoriumsmaus entscheidend beeinflußt wird, ergibt sich für die T. cruzi-Infektion keine Parallele. Obwohl sich in der Literatur auch anderweitige Angaben finden, daß Störungen unter Laboratoriumsbedingungen auf die Tiere erheblichen Einfluß ausüben können (beispielsweise Körpergewichtsstillstand bei Ratten , STEINBERG und WATSON, 146), ist es schade, daß für das Experiment von KRETSCHMAR und HAAKH (80) keine Art einer quantifizierten Störgröße gefunden wurde. Das ist natürlich grundsätzlich möglich. -

Jedenfalls zeigen übliche Laboratoriumsbeunruhigungen keinen Einfluß auf den Verlauf der T. cruzi- Infektion.

Die Prüfung des Zahlengutes Prämortaler Trypanosomen-Mengen zeigte, daß n i c h t lactierende Mäuse im Vergleich zu lactierenden ein weit höheres Endniveau erreichen. Das Ergebnis spricht für die Bedeutung des Zeitfaktors. - Die leider verhältnismäßig große Differenz der Individuenzahlen in beiden Blöcken wird andererseits durch eine doch ansehnliche Quantität von immerhin 30 Tieren in der kleineren Stichprobe der lactierenden Mäuse ausgeglichen. - Obwohl die Daten der Kontrollmäuse mit den Extremwerten (vgl. Abb. 17!) jenseits $|170 \cdot 10^3|$ nach der "Ausreißer - Regel " (vgl. KOLLER, 69, S. 282) nicht "gestrichen" werden dürfen, empfiehlt sich dennoch ein Vergleich im Deckbereich der Verteilungen der Zählwerte beider Gruppen. Die Extremwerte der lactierenden Tiere reichen bis zur Grenze von $|170 \cdot 10^3|$. (Bei zunehmender Meßwertzahl - Kontrolltiere! - wächst ja die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Extremwerten). - Bearbeitet man die Daten beider Gruppen nach dem STUDENT - Verfahren o h n e die Spitzenwerte der Kontrollmäuse, gelangt man immer noch zu einer Differenzwahrscheinlichkeit beider Mittelwerte von $p < 0{,}01$.

Das Versuchsergebnis legt besonders die Frage nach den intrazellulären Leishmaniaformen dieses Parasiten nahe. Entsprechende quantitativ begründete pathologisch- histologische Untersuchungen wären von Interesse.

Über die Frage der Abwehrlage von Jungen infizierter lactierender Mäuse gegenüber T. cruzi (Vers. IIIAk) bzw. Trypanosomeninfektionen überhaupt, besteht noch keine endgültige Einigkeit. - 1928 fanden NATTAN und LARRIER (119) bei der Untersuchung der Milch auf Antikörper, daß durch diese keine Antikörper von infizierten Müttern auf die Jungen übertragen werden. 1939 stellte aber KOLODNY (73) fest, daß aktiv immunisierte cruzi - Ratten ihre Immunität auf das Junge übertragen. Auch CULBERTSON (20) kam bei seinen Versuchen zum selben Ergebnis. Nach diesen Autoren werden Antikörper reichlich und unversehrt mit der Milch an das Junge weitergegeben. 1954 gelangte WENDEL (151,152) auf Grund seiner Experimente an Goldhamstern und weißen Mäusen wiederum zur Ansicht, daß weder Antikörper noch Trypanosomen von der Mutter auf das Junge übertragen werden. - Aus diesen Angaben geht also hervor, daß noch keine eindeutige Antwort auf die Frage besteht. - Das Ergebnis von Versuch III A k würde also die Ansicht von NATTAN-LARRIER (119) und WENDEL (151, 152) stützen. - Einen wichtigen Beitrag zur Lösung des Problems werden sicher die zur Zeit von KRETTLI (79) ausgeführten Milz - Experimente an T. duttoni - infizierten Mäusen bringen. - **Nicht auszuschließen ist, daß die im Experiment III A k verabreichte Trypanosomendosis ($|30 \cdot 10^3|$) immer noch zu hoch war. Die oben ausgesprochene Vermutung wäre bei Ermittlung einer gerade noch infektiös wirksamen Minimaldosis besser gestützt; sodaß also mit Zuverlässigkeit eine etwa vorhandene Differenz der Abwehrlage der beiden Jungengruppen nicht nivelliert werden wäre.**

b) Kausalanalytischer Teil der Versuche zur T. cruzi-Infektion in der Lactation

Schon bei oberflächlicher Betrachtung der Abbildung 5, die den Parasitämieverlauf von unmittelbar nach der Geburt infizierten lactierenden Mäusen im Vergleich zu dem von Kontrollmäusen zeigt, drängt sich der Eindruck auf, daß die Kurven beider Tiergruppen m. o. w. parallel verschoben verlaufen.

Die Feststellung würde also bedeuten, daß das unterschiedliche Verhalten der lactierenden Mäuse in Wahrheit durch eine initiale Hemmung der Parasitenentwicklung nach der Infektion bedingt ist. Nach deren Überwindung würde die Vermehrung der Protozoen in beiden Tiergruppen gleich schnell verlaufen.

Nach Abb. 5 wäre weiterhin formal auch eine erhebliche Verdünnung der Trypanosomen in lactierenden Mäusen denkbar. In der Gravidität kommt es zu einer in die Lactationszeit hinein anhaltenden Zunahme des Plasmavolumens und so - hält die Vermehrung der Erythrocyten nicht Schritt - zu einer physiologischen Verdünnungsanämie (eingehende Darstellung bei HYTTEN und LEITCH, 56; ferner HUBER et al., 55; LINK und LINK-STEINER, 88; TURNER und HELLMAN, 148; REYNOLDS, 132; HANSARD et al. 43 und BOND, 10). Zumindest beim Menschen sind die

Verhältnisse noch umstritten (DONOVAN et al., 26). Gegen eine solche Parasiten - Verdünnungshypothese spricht vielleicht u. a. - wenigstens rein physikalisch - daß die allgemeine Plasmazunahme in der Gravidität aller Säugetiere weit erheblicher ist und daß sich nach unseren stets durchgeführten Wägungen, das Gewicht der Mäuse nach der Geburt kaum von dem der Kontrolltiere unterschied. Ferner wurden in einem Nebenversuch mit 10 lactierenden gesunden Mäusen (10. Lactationstag) und 10 Kontrollmäusen gleichen Gewichts und Alters der Hämatokrit nach WINTROBE sowie Erythrocytenzahl und Hämoglobin nach SAHLI bestimmt (Blutentnahme aus dem venösen Augenplexus). Es konnten keinerlei signifikante Differenzen ermittelt werden.

Es fand sich:

	Hb(g/100ml)	Erythroc. 10^6/mm³	Hämatokrit (% Erythroc.)
Lact. Mäuse 10. Lact. Tag 10 Junge	11,7±0,9	8,78±0,2	35±2,5
Normale w. Mäuse	13,7±0,3	9,07±0,2	40±2,5
p	> 0,05	> 0,05	> 0,05

TAB. 22

Ergebnis eines Nebenversuches: Hämoglobin-, Erythrocyten- und Hämatokritwerte lactierender und normaler Mäuse (10. Lactationstag).

Die Werte der Normaltiere stimmen gut mit den Messungen und Zählergebnissen andere Autoren überein (zusammenfassende Darstellung bei KOLß, 68; SCHMIDLA, 139 und HAGEMANN, 41) . - Gegen die von uns durchgeführten Bestimmungen sind freilich Einwände zu erheben. Und zwar:
1.) daß sowohl in der Gravidität (HYTTEN und LEITCH, 56) nicht nur das P l a s m a v o l u m e n vieler Säugetiere, u. a. von Ratte und Maus anwächst (TURNER und HELMAN, 148 ; HANSARD et al., 43 und BOND, 10), sondern auch das Erythrocytengesamtvolumen (HANSARD, 43; BOND, 10 und JEFSON et al., 60, 61) zunimmt; sog. " Lactationspolycythaemie ". Somit ist also die Hämatokritbestimmung in Frage gestellt. REYNOLDS (132) und BOND (10) fanden trotz ausgeprägter Hypervolämie bei den von ihnen untersuchten Tierarten (Rinder und Ratten) normale Hämatokritwerte. - 2.) Die Hb - Ermittlung nach SAHLI ist sehr unzulänglich. Leider stand unserem Laboratorium nur diese Möglichkeit zur Verfügung. Allerdings ist der Fehler bei Vergleichsversuchen nur relativ. Wirklich befriedigend und sinnvoll könnte nur eine direkte Bestimmung des Plasmavolumens (bzw. totalen Blutvolumens) z.B. mit Evans-Blau oder mit Hilfe radioaktiver Substanzen (vgl. HÜMER et al., 55) bzw. dem von KUNI und TROST (81) entwickelten Gerät sein. - Dennoch war die mit den angegebenen Mitteln ausgeführte Untersuchung sinnvoll; ein konstruktives Ergebnis hätte sie aber nur

bei signifikanten Differenzen geliefert.
Daß aber eine Zunahme des Plasmavolumens eine Verminderung der Parasitenkonzentrationen im Blut bis zum nahezu Zehnfachen im Vergleich zu Kontrolltieren erklären könnte, erscheint nach den Angaben der oben zitierten Autoren ausgeschlossen (Als Extrem fanden HANSARD et al., 43, bei normalem Hämatokrit bei lactierenden Eseln eine Zunahme des totalen Blutvolumens um 25%!). - Auf die Weise kann auch weder das Überleben lactierender Mäuse erklärt werden (auch kein einziges Mal überlebte ein Normaltier die jeweils verwendete Dosis), noch das sehr verschiedene Steigungsverhalten der kleinen Parasitendosen entsprechenden Kurven (Vers. III A b, Abb. 16).
Eine Reihe von Autoren berichtet über die Übertragung von Trypanosomen - u. a. von T. cruzi - durch die Milch auf die Jungen (so z. B. NATTAN - LARNIL, 118; LANFRANCHI, 83; VELU - EYRAUD, 149). MÜHLE (151,152) bestreitet das allerdings. - Trypanosomenentzug über die Milch - unter der Annahme, er wäre massenweise möglich - wäre insofern von Interesse, als auch er einen Großteil der Versuchsergebnisse formal vollständig erklären könnte. Freilich widerlegt das Ergebnis von Versuch III A d (Entfernung der Jungen von der Mutter unmittelbar nach der Geburt und unmittelbar vor der Infektion) die Hypothese. -

Es kann nicht dazu Stellung genommen werden, ob die Beobachtung WERNER's zutrifft. Es erscheint aber überlegenswert, ob die Frage allein durch Untersuchung des Blutes der Jungtiere - wie [illegible] es tat - gelöst werden kann. Unseres Erachtens kann die Antwort nur durch Analyse der M i l c h der Mäuse auf Trypanosomen gewonnen werden, bzw. Prüfung der Milch auf Infektiosität. Daran ändern auch die Versuchsergebnisse von KOLOBNY (72) nichts, der eine orale Empfänglichkeit besonders junger Ratten gegenüber T. cruzi feststellte. Aber die Infektion per os ist weniger wirksam als die parenterale. Der Befund seiner Arbeit wird durch die Experimente von MARCELLI (101) noch präzisiert und so die Aussagekraft der Methode von WERNER eingeengt. Milch zur Prüfung auf Trypanosomen (einschließlich zur Feststellung ihrer Lebensdauer etc. in Milch) auf verschiedenste denkbare Weisen könnte im schlechtesten Falle aus dem Magen von Saugmäusen gewonnen werden bzw. einer der von COX und MUELLER (19), MC DERMEY et al. (106) oder FELLER (30) angegebenen Apparaturen.

Auch ein etwaiger Toxinentzug durch die saugenden Jungen würde zwar das Länger-(oder Über-) leben lactierender Mäuse plausibel machen, wäre aber nicht in der Lage, die gehemmte Parasitämie zu erklären. - Weiterhin spricht ja auch das Ergebnis von Versuch IIIA d gegen eine solche Hypothese.

Die Immunbiologie von Trypanosomen wie parasitischen Protozoen allgemein, stellt ein weites und unübersichtliches Feld dar. (Einen Überblick geben etwa die Arbeiten von LUMSDEN, 91; HAEKELT, 98 und HAUCK, 120).

Es kann als gesichert gelten, daß in T. cruzi - infizierten Mäusen Antikörper am 6. Tag nach der Infektion erscheinen, um am 15. einen Gipfel zu erreichen (PIZZI et al., 129 b). - Andererseits liegt der Gipfel der 19 - s - Antikörperbildung (Opsoninwirkung) bei der Maus bereits am 4. Tage p.i. (WIGZELL et al., 156). Da aber lactierende Mäuse bereits am 4. Tage p.i. gegenüber Kontrollen ein signifikantes Trypanosomendefizit aufweisen, kann als etwaige Ursache der Beobachtungen an eine unspezifische oder spezifische (mittels Opsonine - ROWLEY et al. , 133, 134) Phagocytosesteigerung gedacht werden.

Zum Test wird bei E.A.T.R.O. ebenfalls Heparin (KAHNITZ, 78) verwendet. Somit kann das Gelingen für der bewährten Methode zumindest das Komplement nicht verantwortlich gemacht werden, da Heparin als Polyanion schon in geringsten Mengen Komplement zerstört (Näheres bei SCHMIDT, 140) und zweitens auch die Reaktion bei 4°C durchgeführt wird (Maximum der Komplementwirkung bei 37°C). - Man kann vermuten, daß die von CUNNINGHAM und VAN NOEVE (22) angegebene Reaktion darauf beruht,

daß in vitro Antikörper mit Trypanosomen reagieren. Diese mit Antikörpern beladenen Parasiten werden nach der Injektion in Mäuse leichter phagocytiert. Diese als "Opsonine" (WRIGHT und DOUGLAS, 158) bezeichneten 19 - s. u. K. steigern die Phagocytose erheblich (ROWLEY, 133,134; BOYDEN, 12 u. a. ; vgl. auch SABA und DI LUZIO, 135 sowie SABA et al. , 136). Versuch IIIBa brachte keinen Unterschied in der Absterbezeit der mit verschiedenen Serumgemischen behandelten Mäuse. Danach ist zu schließen, daß spezifische Phagocytosemechanismen keine Erklärung für das Länger- oder Überleben lactierender Mäuse geben können. - Dennoch erscheint eine Wiederholung des Versuches ohne Heparinverwendung sowie unter Komplementzugabe und Inkubation des Gemisches bei 37°C (Maximum der Komplement-Wirkung) sinnvoll, damit A.K. beladene Trypanosomen von Komplement angegriffen werden könnten. Neben anderen immunbiologischen Versuchsansätzen sollte auch an die Komplementbindungsreaktion gedacht werden, wie sie ausführlich von MAYBELL (96) geschildert wurde. - Sie wurde von uns wegen der sehr schweren Antigenherstellung nicht angewandt.

Daß die Fähigkeit zur vermehrten Antikörperbildung der lactierenden Milchdrüse (OUTTERIDGE et al., 123; LASCELLES et al., 84) zur Erhellung der Phänomene beitragen könnte, erscheint als sehr unwahrschein-

lich. Die Autoren fanden, daß A.K. in der Brustdrüse lokal gebildet werden und im Kolostrum auftreten. Sie fallen innerhalb der ersten Woche der Lactation ab. - Einen solchen Mechanismus für die gesteigerte Infektionsresistenz in Betracht zu ziehen, scheint deshalb kaum in Frage zu kommen, da die in der Brustdrüse in enger Nachbarschaft zum Drüsenepithel gebildeten A.K. wegen der relativen Undurchlässigkeit des Drüsenepithels (siehe oben genannte Autoren !) nicht ins Plasma gelangen können, wo sie zur Neutralisation der Parasiten gefordert werden müssen.

Auch das Experiment mit dem Hypophysen - Vorderlappen - Hormon Prolactin brachte im Vergleich zu NaCl - beimpften Mäusen keine unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich Parasitämieverlauf und Sterbezeit. Kein Tier überlebte. Es handelte sich um ovines Prolactin, das vor wenigen Jahren etwa durch DIXON et al. (24) sowie REISFELD et al. (131) biochemisch charakterisiert wurde. Umfangreiche zusammenfassende kritische Abhandlungen über die Physiologie der Lactation und die Rolle des Prolactins liegen von COWIE und FOLLEY (18), LYONS et al. (94) , LINZELL (89), MEITES et al. (109) sowie der WHO (155) vor. Prolactin ist als Hauptkomponente am Zustandekommen wie der Aufrechterhaltung der Lactation beteiligt, u. a. mit Steroiden der Nebennierenrinde und Oxytocin. - Die Anwendung von

Prolactin allein erscheint u.a. insofern gerechtfertigt, da von ihm in jüngerer Zeit, vor allem auch in der Maus, eine ganze Reihe morphologisch wie biochemisch faßbarer Wirkungen bekannt geworden sind, die z.T. durch die Beigabe anderer Hormone sogar abgeschwächt werden (JEREN et al., 159, 160; BECK et al., 9). - Die Gabe von 2 I.E. Prolactin hat ihre Vorlage in einer Angabe von MEITES et al. (109, S. 246), wonach in der Ratte - auch während der Lactation - nicht mehr als 2 I.E. beträgt. Die Dosis von 20 I.E. liegt im unteren Größenbereich der Prolactinanwendung der meisten Untersucher (in Bezug auf die Ratte), u.a. auch von COLE (17). Allerdings verabreichten einige der Autoren die Menge zweimal täglich. Gedacht war u. a. an eine etwaige Stimulierung der Antikörperbildung durch dieses anabole Proteohormon (leider konnte entsprechende Literatur nicht gefunden werden). - Zu denken ist weiterhin an systematische Hormon-Kombinationsversuche (besonders in Verbindung mit ACTH oder Cortisolacetat), gegebenenfalls mit Zerstörung von endokrinen Drüsen (Hypophysektomie etc.). Von Interesse könnten auch Vorbereitungen mit den Hormonen der Gravidität, bzw. Prolactin längere Zeit mit oder ohne diese Hormone sein. - Vielleicht bringen auch Experimente mit hormoneller Lactationsunterbrechung (vgl. z.B. FLOREK, 31) neue Erkenntnisse.

Es sei nochmals darauf hingewiesen, daß dem Futterversuch ("Nutritive Einflüsse", IIIBc) als Kausalexperiment durch Versuch IIIAd (Entfernung der Jungen) die gedankliche Grundlage entzogen wurde. Dieses Experiment fand zeitlich nach dem Futterversuch statt. - Zumindest fraglich ist, ob die hypothetischen Mangelzustände ihre Ursache in der Graviditität haben könnten, da hier ja eine exzessive Parasitenvermehrung stattfindet. Besonders seines eigenartigen Ergebnisses wegen sei der Versuch beschrieben und diskutiert.
Der Futterversuch war auf die Frage hin angelegt worden, ob etwa eine weitgehende Änderung der Nahrungszusammensetzung in der Lage wäre, die Differenz im Krankheitsgeschehen von lactierenden und normalen Mäusen aufzuheben. - Bekannt ist, daß die T. cruzi - Infektion von Ratte und Maus (YORKE und [illegible], 159, 160) wie Infektionskrankheiten allgemein ([illegible] und [illegible], 104) durch Ernährungseinflüsse entscheidend beeinflußt werden können. Dabei werden mit einer gewissen Regelmäßigkeit im Blut ablaufende Protozoenerkrankungen "antagonistisch" (MAYR und BUSCHMANN, 104) beeinflußt, d.h. Fehlernährung schadet dem Wirt und dem Erreger. Solch ein Modell ist in letzter Zeit besonders von KRETSCHMER und HAAKH (80) sowie JACOBI und KRETSCHMER (58) am Beispiel der Nagetiermalaria (Plasmodium berghei) studiert worden. Allerdings blieben hierbei die Mäuse in gutem Allgemeinzustand.

Wenigstens vom Menschen ist geläufig, daß die Lactation ähnlich der Schwangerschaft mit der Verarmung an einer Reihe von Substanzen einhergehen kann: z. B. Calzium oder Eisen (u.a. LINK und LINK - STEINER, 88; HIGOLD, 47), Eiweiß (ARTHUR und HOFBAUER, 4) oder etwa proteingebundener Polysaccharide (HOFMANN -v. BRADEL, 54). Andererseits ist gerade die Ratten- und Mäusemilch durch einen ungewöhnlich hohen Eiweiß-, Fett- und Eisengehalt gekennzeichnet (MEITES et al., 108 sowie sehr ausführliche zusammenfassende Darstellung bei KON und COWIE, 74) , was sich auch in einem entsprechenden Bedarf der Muttertiere ausdrückt (KON und COWIE, 74). Deshalb lag es nahe (eine wesentlich andere Möglichkeit bestand ja auch gar nicht) , den Eiweiß- und Fettgehalt der angebotenen Futtermischung (Futter A) merklich zu heben. Hurilen^{R} besitzt einen hohen Kohlehydratgehalt. - Casein wird von MUELLER und COX (116) ein besonders fördernder Effekt auf Milchleistung und Jungenentwicklung der Ratte zugeschrieben. Ähnliches gilt nach IIJIMA (57), der bezüglich der Maus zur selben Ansicht kommt, auch für Eieralbumin. Beides war im Futter enthalten. Von Bakterieninfektionen ist bekannt, daß proteinreiche Nahrung (besonders Casein) größere Resistenz mit verlängerter Lebenszeit p.i. bedingt (DUBOS et al., 27) Verglichen mit Gluten bewirkt Fütterung mit Casein eine stark vermehrte Leukocytose (GRAY, 36). -

Andererseits ist es möglich, daß die Blutform im Gegensatz zur Kulturform von T. cruzi eine besondere Affinität zum Proteinstoffwechsel besitzt, jedenfalls nicht zum Kohlehydratstoffwechsel (Näheres im Zusammenhang bei v. BRAND, 13 und MANWARING, 2). Allerdings fand NAKAMURA (117) daß T. cruzi im proteinfreien Medium z gedeihen vermag. - Obwohl nicht einmal das Hämoglobin der Mäuse bestim t wurde, erscheint wegen des großen Fleischgehaltes des Futters Eisenmangel unwahrscheinlich. - Nicht erwähnt werden muß, daß die grobe chemische Zusammensetzung von Futter A nicht mit seiner "biologischen Wertigkeit" gleichgesetzt werden darf, über die keine Aussage gemacht werden kann.

Obwohl es selbstverständlich ist, daß im Hinblick auf die Parasitämiefragestellung die Futterzusammensetzung letztlich doch nur sehr willkürlich vorgenommen werden konnte und mußte, steht andererseits außer Frage, daß der hohe Proteingehalt des Futters ausreichen muß, um Eiweißmangel (zumindest in einfacher Form) als Ursache für das häufig beobachtete Jungefressen auszuschließen. Im Gegenteil : "Futter A" bewirkte besonders bei infizierten, aber auch gesunden Mäusen ein deutliches, sicher überzufällig gesteigertes Töten und Verzehren von Jungmäusen. -Untersuchungen über Ursachen des Jungefressens sind von WERNER (153) angestellt worden.-

Was im übrigen die Ernährung von Mäusen mit Fleisch anlangt, sollte insbesondere die Arbeit von MOLL (113) nicht übersehen werden.

Auffällig ist das Ergebnis des Versuches IIIBc: besonders, daß nur die Parasitämie lactierender Mäuse durch das Futter A beeinflußt wird. - Eine Interpretation steht noch gänzlich aus. Eine Unterstützung der die Parasitenvermehrung hemmenden Eigenschaften der Lactation ist ebenso denkbar wie die Möglichkeit, daß Ernährung der Mäuse mit dem "Futter A" im Sinne eines "Antagonismus" wirksam ist.

Auch das Differential - Blutbild verschiedener Mäusegruppen kann offensichtlich - soweit man aus den kleinen Stichproben schließen darf - keinen Hinweis auf ein eigentümliches Verhalten lactierender T. cruzi - infizierter Mäuse liefern. - Auffällig ist auf alle Fälle eine Lymphopenie aller infizierten Tiere, ebenso eine neutrophile Leukocytose derselben. Ferner Leukocytose gesunder lactierender Mäuse. - Lymphopenie bei hoher Leukocytose ist zumindest ein regelmäßiger Befund bei den meisten Infektionskrankheiten des Menschen. Ebenso geht der Prozentsatz der Eosinophilen bei den meisten Infektionskrankheiten zurück. Bei infizierten Mäusen fand sich kein einziger eosinophiler Leukocyt.- Zwischen infizierten lactierenden und infizierten Kontrollmäusen kann kein augenfälliger Unterschied gesehen werden. Gänzlich unauffällig sind auch die Monocyten-

zahlen, denen ein besonderes Interesse galt. Allerdings muß eingeschränkt werden, daß ja auch die Phagocytose-l e i s t u n g bei gleichbleibender Gesamtzahl dieser Zellen gesteigert sein könnte.

Die Blutwerte der drei gesunden Kontrolltiere decken sich zufriedenstellend mit den von PENN (125) angegebenen Zahlen, gleichfalls mit denen der bei SCHILLER (139) und HAUDEK (41) zitierten Autoren. - Allerdings weist SCHILLER (138) auf die unübersichtliche statistische Analyse der Blut- und Knochenmarksbild - Befunde vieler Untersucher hin.

Wahrscheinlich umfangreiche Untersuchungen, besonders biochemischer und pathologisch-anatomischer Art, werden noch erforderlich sein, um Ursache und weitere Seiten des eigentümlichen Verhaltens lactic ender T. cruzi - infizierter Mäuse zu klären. Konsequenzen für die Therapie der Chagaskrankheit des Menschen - ein noch ungelöstes Problem - sind immerhin denkbar. - **Die quantitativ zu schwer faßbare Gewebsphase der Parasitenerkrankung wurde im Verlauf der Untersuchungen bewußt ausgeschnitten.**

V.) ZUSAMMENFASSUNG

1.) Es wird vorgeschlagen, quantitativ bekannte Blutparasiten - Mengen künftig mit Hilfe eines "inversen Dreisatzes" nach der Beziehung

$$V = \frac{V_I \cdot Z_{TB}}{Z_{TI}} - V_B \quad (ml)$$

zu verdünnen und zu übertragen. Die Methode erlaubt die Injektion gänzlich beliebiger, genau bekannter Mikroorganismenzahlen in beliebig variablen Volumina. - Die Anwendung der Formel gestattet optimale Reproduktion von experimentalansätzen.

2.) Ausgehend von der Entdeckung von KRAUPP (76), daß das Trypanosoma duttoni in der Graviditat der Maus eine exzessive Vermehrung erfährt, sowie den häufig beschriebenen congenitalen Chagas-infektionen des Menschen, wurde das Verhalten von Trypanosoma cruzi (CHAGAS 1909) in der Gestation der Maus untersucht. - Es fand sich ebenfalls eine starke Vermehrungszunahme in trächtigen Tieren. Zudem erreichen in der Graviditat die präpartalen Trypanosomenzahlen höhere Endwerte. Auffällig ist, daß die Lebens-

zeit im Vergleich zu Kontrolltieren nicht verkürzt ist. - Zur kausalen Klärung scheint T. duttoni das Modell der Wahl zu sein.

3.) Äußerst eigentümlich verhalten sich lactierende Mäuse. Bei einer Infektionsdosis von $1{,}3 \cdot 10^6$ Trypanosomen / Maus unmittelbar nach der Geburt zeigten sich stets stark erniedrigte Parasitenzahlen im peripheren Blut sowie eine um nahezu ein drittel verlängerte Lebenszeit nach der Infektion ($p < 0{,}001$). - Bei Anwendung der genannten Dosis überlebte mit guter Verlässlichkeit etwa ein zehntel der Mäuse. Das Überleben eines Kontrolltieres wurde in keinem einzigen Falle festgestellt.

4.) Infektion der Mäuse in der fortgeschrittenen Lactation (10. Lactationstag) erniedrigt die Parasitämie und erhöht die Lebenserwartung weiterhin signifikant ($p < 0{,}01$) gegenüber unmittelbar nach der Geburt infizierten lactierenden Tieren.

5.) Die in der Lactationszeit gemachten Beobachtungen sind nur teilweise durch das Vorhandensein saugen-

der Junge bedingt. - Bei Entfernung der Jungen von der Mutter unmittelbar nach der Geburt und unmittelbar vor der Infektion fanden sich ebenfalls mit sehr guter statistischer Sicherung erniedrigte Parasitämie und verlängerte Lebenszeit p.i. In keinem Versuch überlebten aber Mäuse.

6.) Die geschilderten Phänomene sind an die Lactationszeit gebunden. - Acht Tage nach Beendigung der Lactation infizierte Mäuse lassen sich in ihrem Krankheitsverhalten nicht mehr von normalen weiblichen Mäusen unterscheiden.

7.) Verschiedene Jungenzahlen zeigen keine unterschiedlichen Auswirkungen auf den Infektionsverlauf. - Allerdings fanden sich überlebende Tiere nur in der Gruppe mit der größten Jungenzahl pro Maus (10 Saugmäuse).

8.) Zur Infektion lactierender Mäuse mit niedrigeren Dosen wurden zunächst Parasiten - Dosiswirkungsbeziehungen unter Verwendung normaler weiblicher Mäuse erstellt. - Präpatenzzeit der Flagellaten und verabreichte Dosis folgen einer Exponentialbeziehung vom allgemeinen Typ:

$$y = f(t) = C \cdot e^{-kt}$$

bzw.

$$\log y = \log C - k \cdot t \cdot \log e;$$

- als Umkehrfunktion der Zeit in Abhängigkeit von der Dosis y:

$$t \approx -2{,}63 \cdot \log y + 20{,}1 \ [\text{Tage}]$$

Ähnliches gilt im Dosisbereich $1{,}0 \cdot 10^5$ bis $1{,}0 \cdot 10^6$ Trypanosomen / Maus. In diesem Dosisgebiet sind unabhängig von der Dosis die Zeiten sichtbarer Parasitämie konstant (7,44 ± 0,14 Tage).

9.) Bei Infektion lactierender Mäuse mit einer Dosis von $250 \cdot 10^3$ Trypanosomen / Maus, die gerade noch zum Absterben aller Kontrolltiere führt, ist mit dem Überleben der Hälfte der lactierenden Mäuse zu rechnen. Die Lebenszeit der übrigen ist bei stark gesenkter Parasitämie um weiteres verlängert. - Die Beobachtung von KR[illegible]R und H[illegible] (80) an Mäusen mit Nagetiermalaria (Plasmodium berghei), daß Beunruhigungen den Krankheitsverlauf beeinträchtigen, konnte für die T. cruzi - Infektion nicht bestätigt werden.

10.) Mäuse, die auf Grund ihrer Lactation eine T. cruzi

Infektion überlebten, sind wieder voll fortpflanzungsfähig. Durch eine erneute Graviditität werden nicht noch etwa latent vorhandene Parasiten provoziert.

11.) In einem Untersuchungsgut von über 100 Mäusen (normale wie lactierende) wurden die prämortalen Trypanosomenzahlen / mm^3 Blut ermittelt und statistisch bearbeitet. Zudem Prüfung der Verteilungsfunktion im logarithmischen Wahrscheinlichkeitsnetz. Lactierende Mäuse erreichen mit $p < 0{,}01$ nur wesentlich niedrigere prämortale Parasitenwerte als normale.

12.) Die Abwehrlage von Jungen infizierter lactierender Mäuse unterscheidet sich bei einer Infektion mit T. cruzi nicht von der der Jungen gesunder Mütter. - Damit konnte die Auffassung verschiedener Autoren bestätigt werden.

13.) Ein Neutralisationsversuch gab keinen Anhalt für eine immunbiologische Ursache als Erklärung des Verhaltens T. cruzi - infizierter lactierender Mäuse.

14.) Auch das Hormon Prolactin konnte die Parasiten-

entwicklung nicht beeinflussen.

15.) Ebenfalls konnte die Prüfung nutritiver Einflüsse keinen ursächlichen Hinweis liefern. Das für den entsprechenden Versuch entwickelte Futter, das sich durch einen äußerst hohen Protein- und Fettgehalt auszeichnete, bewirkte aber selektiv eine hochsignifikante Verlängerung der Lebenszeit lactierender Mäuse, n i c h t von Kontrolltieren. - Eiweißmangel kann nicht schlechthin als die Ursache des Jungefressens angesehen werden. - Die Xenodiagnose an den überlebenden, lactiert habenden Mäusen dieses Versuchs mit Raubwanzen der Art Rhodnius prolixus (nach 3 Monaten) verlief negativ.

16.) Auch die Differential - Blutbilder verschiedener Mäusegruppen brachten keinerlei ursächlichen Anhalt.

VI.) LITERATURVERZEICHNIS

1) ALBERT, Z. - The influence of living in large and small groups on the development of cancer of the breast in mice of the R III strain. - Pat. pol. 7, 129 (1955)

2) ANDERVONT, H.B. - Influence of environment on mammary cancer in mice. - J. nat. Cancer Inst. 4, 579 (1944)

3) APT, W. - Transmission congenita. Estado actual del problema. I. Introduccion y generalidades. - Bol. Chilen. parasitol. 19, 31 und 95 (1964)

4) ARTHER, J., HOFBAUER, R. - Das Eiweißspektrum des Blutserums vor der Schwangerschaft, während der Schwangerschaft und im Wochenbett. - Z. Geburtsh. Gynäkol. 163, 1 (1964)

5) AX, W., KABOTH, U., FISCHER, E. - Immunbiologische Studien am Omentum (Maus). - Z. Naturforsch. 21 b, 782 (1966)

6) BAKER, J.R. - The influence of the number of trypanosomes inoculated on the prepatent period of the subsequent trypanosomiasis in laboratory rodents. - Ann. Trop. Med. Parasitol. 54, 71 (1960)

7) BARKEMA, R.M. - Influence of different numbers of males per cage on various characteristics

of mice (Mus musculus domesticus). - Z. Versuchstierkunde 2, 55 (1963)

8) BATES, R.W., MILKOVIC, S., GARRISON, M. - Effects of prolactin, growth hormone and ACTH, alone and in combination upon organ weights and adrenal function in normal rats. - Endocrinology 74, 714 (1964)

9) BECK, C.J., GONDA, A., HAMID, H., MORGEN, R.O., RUBINSTEIN, D., MC GARRY, E.E. - Some metabolic changes induced by primate growth hormone and purified ovine prolactin. - Metabolism 13, 1109 (1964)

10) BENDER & HOBEIN (Firma) - Mitteilung der Firma am 20.2. 1967

10') BOND, C.F. - Blood volume changes in the lactating rat - Endocrinology 63, 285 (1958)

11) BOSCH, H. - Persönliche Mitteilung von Herrn Dr. H. Bosch, Dt. Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie am 9. 1. 1967

12) BOYDEN, S. - Cellular recognition of foreign matter- Internat. Rev. Exp. Pathol. 2, 311 (1963)

13) v. BRAND, TH. - Chemical Physiology of Endoparasitic Animals - (New York, 1952; Academic Press)

14) BRENER, Z. - Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with T. cruzi - Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo 4, 389

15) BROSS, I. - Estimates of the LD_{50} : a critique - Biometrics 6, 413 (1950)

16) BRUMPT, E. - Le xenodiagnostique. Application au diagnostic de quelques infections parasitaires et en particulier à la trypanosome de Chagas. - Bull. Soc. Path. Exot. 7, 706 (1914)

17) COWIE, A.T. - The maintenance of lactation in the rat after hypophysectomie - J. Endocrinol. 16, 135 (1957)

18) COWIE, A.T., FOLLEY, S.T. - Physiology of the gonadotropine and the lactogenic hormone in "The Hormones", vol. III, (Thimann) - ed. 6. Pincus; New York 1955

19) COX, W.M., MUELLER, A.H. - The composition of milk from stock rats and an apparatus for milking small laboratory animals - J. Nutrit. 13, 249 (1937)

20) CULBERTSON, J. - The natural transmission of immunity against T. duttoni from mother mice to their young - J. Immunol. 38, 51 (1940)

21) CULBERTSON, J. T., KESSLER, W. - Age resistance of mice to T. cruzi - J. Parasitol. 28, 154 (1942)

22) CUNNINGHAM, M.P., VAN HOEVE, K. - Serological neutralization of trypanosomes - East African Trypanosomiasis Research Organization (E.A.T.R.O.) Report, 1963 (Nairobi)

23) DANFORTH, W.F. - Research in Protozoology - vol. 1 (Pergamon Press, Oxford 1967) - ed.Tze - Tuan Chen

24) DIXON, J.S. - CHOH HAOLI - Chemistry of prolactin Metabolism 13, 1093 (1964)

25) DOMINGUEZ, A., JAFFÉ, R. - Beiträge zur Biologie des Entwicklungszyklus von T. cruzi im infizierten Organismus - Z.f. Tropenmed. u. Parasitol., 13, 304 (1962)

26) DONOVAN, J.C. et al. - Effect of lactation on blood volume in the human female - Am. J. Gynec. 93, 588 (1965)

27) DUBOS, R.J., SCHAEDLER, R.W. - Effect of dietary proteins and amino acids on the susceptibility of mice to bacterial infections - J. Exp. Med. 108, 69 (1958)

28) EDWARDSON, J.A., EAYRS, J.T. - Neural factors in the maintenance of lactation in the rat - J. Endocr. 38, 51 (1967)

29) ELKELES, G. - Über die Chagaskrankheit und das T. cruzi sowie die anderen amerikanischen Trypanosomeninfektionen - Z. Tropenmed. Parasitol. 10, 268 (1959)

30) FELLER, W.F. - Semiautomatic apparatus for milking mice - J. Nat. Cancer Inst. 38, 11 (1967)

31) FLOREK, E. Untersuchungen zur hormonellen Abstillung-Praxis (Schweiz. Rundschau für Med.) 55, 1169 (1966)

32) [illegible] IGI, L.L. - Chronic and progressive myocarditis and myositis in C3H mice infected with T. cruzi - Am. J. Trop. Med. Hyg. 13, 272 (1964)

33) [illegible], H. - Über den Einfluß des Cortisons auf die Phagocytoseleistung der Makrophagen - Arch. exp. Path. Pharm. 216, 506 (1952)

34) GALLIARD, H., LE PIERRE, J., COSTE, M. - Protection croisée entre souches hétérologues de T. cruzi chez la souris. Son inhibition par la cortisone. - C.R. Soc. Biol. 156, 1267 (1962) - Paris -

35) GEIGY (Firma) - "Documenta Geigy - Wissenschaftliche Tabellen" - 6. Aufl. (J.R.Geigy A.G., Basel 1960)

36) JAMY, I. - Effect of protein nutrition on leukocyte mobilization - Proceed. Soc. Exp. Biol. Med. 116, 414 (1964)

37) [illegible], C.E. et al. - Effect of auditory, olfactory and optic stimuli upon milk ejection and suckling - induced release of prolactin in lactating rats - Endocrinology 80, 840 (1967)

38) [illegible], C.D. - Cancer of the breast in pregnancy and during lactation - Am.J. Obst. Gynec. 98, 141 (1967)

39) [illegible], A. - Persönliche Mitteilung 4.8.64. (Farbenfabriken Bayer A.G., Wuppertal - Elberfeld)

40) [illegible], . - Persönliche Mitteilung 27. 9. 1966 (Farbenfabriken Bayer A.G.)

41) HAGEMANN, E. - Ratte und Maus, p. 79 ff (W. de Gruyter - Verlag, Berlin 1960)

42) HALPERN, B.N., PACAUD, M. - Technique de prélèvement d' échantillons de sang chez les petits animaux de laboratoire par ponction du plexus ophthalmique - C.R. Soc. Biol. 145, 1465 (1951) - Paris -

43) HANSARD, W.J., SUTTON, J.R., J.O., COHAR, C.L., HOBBS, S.C. - J. Animal Sc. 12, 402 (1953) - zitiert nach 26

44) HAUSCHKA, TH.S. - Index of host as a factor in Chagas disease - J. Parasitol. 33, 399 (1947)

45) HAUSCHKA, T.S. - Persistence of strain - specific behaviour in two strains of T. cruzi after prolonged transmission through inbred mice - J. Parasitol. 35, 593 (1949)

46) HAUSCHKA, T.S. - Immunological relationship between seven strains of T. cruzi and its application in the diagnosis of the Chagas' disease - Am. J. Trop. Med. Hyg., 20, 1 (1950)

47) HEROLD, K. - Behandlung und Vorbeugung der Anämie im Wochenbett - Zbl. Gynäkol. 86, 1313 (1964)

48) HEWITT, R., ENTWISTLE, J., GILL, E. - Quantitative determinations of critical mortality periods in untreated and treated infections with the B strain of T. cruzi in mice. - J. Parasitol. 49, 22 (1963)

49) HOARE, C.A. - Morphological and taxonomic studies on the mammalian trypanosomes - VIII. Revision of T. evansi. Parasitol. 46, 130 (1956)

50) HOARE, C.A. - Révision de la classification des trypanosomes pathogènes Africains. - VI. int. Sci. Comm. Tryp. Res. 67 (1956)

51) HOARE, C.A. - The classification of the trypanosomes of veterinary and medical importance - Vet. Rev. Annot. 3, 1 (1957)

52) HOARE, C.A. - Morphological and taxonomic studies on the mammalian trypanosomes - IX. Revision of T. dimorphon. Parasitol. 49, 210 (1959)

53)HOARE, C.A. - Morphological and taxonomic studies on the mammalian trypanosomes - X. Revision of the systematics J. Protozool. 11, 200 (1964)

54) HOFFMANN, J. - v. BRANDEL - Untersuchungen über Serumeiweißveränderungen und das Verhalten protein gebundener Serumpolysaccharide post partum - Inaugural - Diss. Med. Fak. Eberhard - Karls - Univ., Tübingen (1958)

55) HOSSE, H., LEWIS, S.H., SZUR, L. - Zur Frage der Verdünnungsanämien und Blutvolumenveränderungen bei verschiedenen Anämieformen - Med. Klinik 60, 668 (1965)

56) HYTTEN, F.E. ,LEITCH,I. - The physiology of Human pregnancy - (Blackwell Scientific Publications) Oxford 1964

57) IIJIMA, M.- The effect of maternal nutrition on the development of the offspring

b) The effects of [illegible] protein concentration in the [illegible]
[illegible] Paediatr. Jap. 7, 44 (19[illegible])

c) The effect of [illegible] protein and [illegible]
acids - ibid. 7, 51 (19[illegible])

58) [illegible], K., [illegible] - Die [illegible]therapie der
[illegible] ([illegible])
- Z. Tropenmed. Parasitol. 13, 206 (19[illegible])

59) [illegible], J.H., [illegible], L. - Effect of prolactin
on erythropoiesis in the mouse - [illegible] (19[illegible])

60) [illegible], J.H., [illegible], L. - Erythropoiesis during
pregnancy and lactation in the mouse
Effect of [illegible] on erythropoiesis during
lactation - Proc. Soc. Biol. Med. [illegible], 500 (1965)

61) [illegible], J.H., [illegible], L. - The role of erythropoie-
tin - ibid. [illegible], [illegible] (19[illegible])

62) [illegible], I.G., [illegible], L. - Immunologic studies on
T. cruzi
Susceptibility of [illegible] mice for the [illegible]
strain of T. cruzi - J. Infect. Dis. [illegible], [illegible] (19[illegible])

63) [illegible], I.G. - Acquired immunity in mice infected with
avirulent [illegible] strains of T. cruzi - ibid. [illegible],
[illegible]68 (196[illegible])

64) [illegible], I.G. - Duration of acquired immunity in mice
initially infected with [illegible] strain of T.
cruzi - ibid. [illegible], [illegible]3 (1961)

65) KAGAN, JG., NORMAN, L., ALLAIN, D. - T. cruzi isolated in the United States: a review - Rev. Biol. Trop. 14, 55 (1966)

66) KÖBERLE, F. - Über Enteromegalie - Zbl. Path. 96, 244 (1957)

67) KÖBERLE, F. - Die Chagaskrankheit - ihre Pathogenese und ihre Bedeutung als Volksseuche - Z. Tropenmed. Parasitol. 10, 236 (1959)

68) KOLB, E. - Körper- und Zellbestandteile (Allgemeines und Hauptorgane) p. 330ff. in: Biochem. Taschenbuch, 2. Teil, 2. Aufl. (Springer Verlag, Berlin 1964) - ed. H.M. Rauen

69) KOLLER, S. - Statistische Auswertungsmethoden - in H.M. Rauen / Biochem. Taschenbuch, II. Bd. 985, (Springer Verlag, Berlin 1964)

70) KOLMER, J.A. - A method transmitting known numbers of try anosomes with a note on the numeric relation of trypanosomes to infection - J. Infect. Dis. 17, 79 (1915)

71) KOLODNY, M.H. - Studies on age resistance against trypanosome infections
The resistance of rats of different ages to infection with T. cruzi - Am. J. Hyg. 29, 13 (1939) Sect. C

72) KOLODNY, M.H. - The influence of the age of the rat upon ex-

perimental infections with T. cruzi per os. - ibid. 39, 155 (1939)

73) [illegible], [illegible] - The transmission of immunity in experimental trypanosomiasis (T. cruzi) from mother rats to their offspring - [illegible] 5, [illegible] ([illegible])

74) [illegible], [illegible], [illegible] (ed.) - Milk: the mammary gland and its secretion.- Vol. II (New York [illegible], Academic Press)

75) [illegible], [illegible] - Ricerche sugli emoparassiti dei micromammiferi selvatici della Sicilia - Riv. parassitol. 18, 249 (1957)

76) [illegible], [illegible] - Experimental study on prenatal infection with Trypanosoma duttoni (Sicilian strain) in mice and its immunological aspects. - Proceedings of the First International Congress of Parasitology (Rome [illegible]). - Vol. I: [illegible] . - Oxford [illegible] (ed by A. Corradetti)

77) [illegible], [illegible], [illegible] - Potentiation of parasitaemia, prolongation of life or survival of lactating mice in infections with T. cruzi - Nature 209, [illegible] ([illegible])

78) [illegible], [illegible] - [illegible] nach dem [illegible] am E.A.T.R.O. - Institut, Tororo, Afrika, 1966

79) KRUMPITZ, H.E. - Persönliche Mitteilung am 2.1. 1968

80) [illegible], W., HAAKH, U. - Die Abhängigkeit des Verlaufs der Nagetiermalaria (Plasmodium berghei) in der Maus von exogenen Faktoren und der Wahl des Mäusestammes. - II. Beunruhigung und Ernährung der Mäuse - Z. Versuchstierkunde 4, 32 (1964)

81) KUNI, H., FROST, A. - Ein neuartiges halbautomatisches Gerät für Blutvolumenbestimmung und Meßprobenvergleich - Atompraxis 12, 1 (1966)

82) LUMSDAINE, F.L. - Notes on the growth curve of T. cruzi Chagas 1909 as determined by optical density - Rev. Inst. Med. trop. Sao Paulo 8 (6) : 249 (1966)

83) LEVADITI, A. - Sur le passage des trypanosomes dans le lait - Bull. Soc. Path. exot. 8, 438 (1915)

84) LASCELLES, A.K., CUTTRIDGE, P.M., MCKENZIE, D.D.S. - Local production of antibody by the lactating mammary gland following antigenic stimulation - Aust. J. exp. Biol. Med. Sci. 44, 169 (1966)

85) LEHRER, G.D., OLINSKY, A.J. - Chagas' disease study in a group of individuals bitten by North American triatomids - Aeromed. Rev. 9, (1965) - USAF School of Aerospace Medicine, Texas

86) LTL (Firma) - Mitteilung der Herstellerfirma Latz K.G. / Euskirchen - Rhld. 18. 1. 1967 (Purino - Fleischmehl)

87) LINDEN, A. - Planen und Auswerten von Versuchen (Birkhäuser - Verlag, Basel 1959)

88) LINK, G., LINK - SCHINZ, R. - Die Anämie im frühen Wochenbett - Med. Welt, 18, 1911 (1967)

89) LINZELL, J.L. - Physiology of the mammary gland - Physiol. Rev. 39, 534 (1959)

90) LORENZ, P. - Über die Analyse von Verteilungskurven - Technik 2, 83 (1947)

91) LUMSDEN, W.H.R. - Biological aspects of trypanosomiasis research in "Advances in Parasitology" vol. 3 (London 1965, Academic Press) - ed. Ben Dawes

92) LUMSDEN, W.H.R., GITHATHA, S.K., LUCK, M. - Lack of influence of sex and post - weaning age on the susceptibility of mice to trypanosome infection - Transact. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 61, 141 (1967)

93) LUMSDEN, H.W.R., HERBERT, J. - Phagocytosis of trypanosomes by mouse - peritoneal macrophages - Transact. Royal Soc. Trop. Med. Hyg. 61, 142 (1967)

94) LYONS, W.M.R., LI, C.H., JOHNSON, R.E. - The hormonal control of mammary growth and lactation in "Recent Progress in Hormone Research" vol. XIV (New York, 1958) - ed. G. Pincus

95) MAEKELT, G.A., LOPEZ, J.F. - Reaccion de desviacion del complemento pava el diagnostico de la forma cardiaca de la enfermedad de Chagas - Acta cient. Venezol. 7, 128 (1956)

96) MACKELT, G.A. - Die Komplementbindungsreaktion de Chagskrankheit - Z. Tropenmed. Parasitol. 11, 152 (1960)

97) MACKELT, G.A. - A modified procedure of xeno-diagnosis for Chagas' disease - Am. J. Trop. Med. Hyg. 13, 11 (1964)

98) MACKELT, G.A. - Immunity mechanisms to protozoa - Analysis and classification of immunity mechanisms of the vertebrate host in "Biology of Parasites" (Academic Press, New York, 1966)

99) MARCUS, H., WIGAND, R., PIROTH, M. - Über die Resistenz von Mäusen gegenüber T. cruzi - Z. Tropenmed. Parasitol. 15, 279 (1964)

100) NELSEN, P.D. - T. cruzi infections in CFI mice I) Mortality with different doses of trypanosomes - Ann. Trop. Med. Parasitol. 61, 57 (1967)

101) NELSEN, P.D. - II) Infections induced by different routes - ibid. p. 62

102) NELSEN, P.D., HUGSTROM, J.W.C. - Some aspects of the pathology of a Peru strain of T. cruzi in beagle puppies - Transact. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 61, 14 (1967)

103) [illegible], M., DA ROCHA LIMA, H. - Zum Verhalten von Schizotrypanum cruzi in Warmblütern und Arthropoden - Archiv Schiffs-u. Tropenhyg. 18, 101, (1914)

104) MAYR, A., BUSCHMANN, H. - Beziehungen zwischen Ernährung, Resistenz und Immunität bei Infektionskrankheiten - Tierärztl. Umschau 22, 443; (1967)

105) MAZZOTTI, L. - Effects of inoculating small and large numbers of T. cruzi into mice - Am. J. Hyg. 31, 86; sect. C (1940)

106) MC BURNEY, J.J., MEINER, H., HOAG, W.G. - Device for milking mice - J. Lab. Clin. Med. 64, 485 (1964)

107) MC GARRY, E.E., BECK, J.C. - Some metabolic effects of ovine prolactin in man - Lancet vol. II, 915 (1962)

108) MEINER, H., HOAG, W.G., MC BURNEY, J.J. - Chemical characterization of inured - strain mouse milk. - Gross com osition and amino acid analysis - J. Nutrit. 85, 305 (1965)

109) MEITES, J., NICOLL, CH.S., TALWALKER, P.K. - The central nervous system and the secretion and release of prolactin in "Advances in Neuroendocrinology" (Univ. of Illinois Press, Urbana 1963) - A.V. Nalbandov, ed.

110) MELZER, H., KOLENT, W. - Ein Beitrag zur Klinik und Therapie der Chaga krankheit - Dt. Med. Wochenschr. 88, 368 (1963)

111) MENEZES, H. - A importância do factor sexo na parasitemia e mortalidade de camundongos albinos com infecção experimental pelo T. cruzi - O Hospital 70, 189 (1966)

112) MERCK (Firma) Handelsangabe der Herstellerfirma E. Merck A.G

113) MOLL, R. - Über den Einfluß extremer Fleischernährung auf die Organgewichte weiblicher Albinomäuse - Zool. Anz. 178, 18 (1967)

114) MORRIS, H.P. - Review of the nutritive requirements of normal mice for growth, maintenance, reproduction and lactation - J. Nat. Cancer Inst. 5, 115 (1944)

115) MÜHLPFORDT, H. - Die Generationsdauer verschiedener Trypanosomenarten - Z. Tropenmed. Parasitol. 15, 145 (1964)

116) MUELLER, A.J., COX, W.M. - J. Nutr. 31, 249 (1946); zitiert nach 74

117) NAKAMURA, M. - Cultivation of T. cruzi in a protein- free dialysate medium - Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 125, 779 (1967)

118) NATTAN ,L., LARRIER, P. - Revue de Pathologie comparée, p.282 (1913)

119) NATTAN, L., LARRIER, P. - Anticorps naturels et perméabilité placentaire - C.R. Soc. Biol. 98, 1279 (1928)

120) NAUCK, E.G. - Protozoen als Krankheitserreger:in Handb. der Allg. Pathol. 11.Bd., 2. Teil (Springer-Verlag, Berlin 1965) - ed. F. Büchner, E. Letterer

121) OKUMURA, M., DE BRITO, T., DA SILVA, L.H.P., DA SILVA, A.C., NETTO, A.C. - The pathology of experimental Chagas' disease in mice: I) Digestive tract changes, with a reference to necrotizing arteritis. - Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo 2, 17 (1960)

122) OKUMURA, M., CORRÊA NETO, A. - Producao experimental de "megas" em animais inoculados com T. cruzi.- Rev. Hosp. Clin. 16, 338 (1961)

123) OUTTERIDGE, P.M., ROCK, J.D., LASCELLES, A.K. - The immune response of the mammary gland and regional node following antigenic stimulation - Aust. J. exp. Biol. Med. Sci. 43, 265 (1965)

124) PITAU, K. - Zur statistischen Beurteilung von Messungsreihen (Eine neue t-Tafel) - Biol. Zbl. 63, 152 (1943)

125) PENNY, R.H.C. - The blood and marrow picture of the laboratory mouse - Br. vet. J. 123, 227 (1967)

126) PHILLIPS, N.R. - Experimental studies on the quantitative transmission of T. cruzi: Considerations regarding the standardization of materials. - Ann. Trop. Med. Parasit. 54, 60 (1960)

127) PIEKARSKI, G. - Lehrbuch der Parasitologie, S. 81 (Springer Verlag, Berlin 1964)

128) PIEKARSKI, G., MESKE, CH. - Experimentelle Infektionen mit pathogenen Protozoen - in: Handb. exp. Pharmakol. 16. Bd., Teil 9, Infektionen I, 176 (Berlin 1964) Ed. O. Eichler und A. Farah

129a) PIZZI, P.T. - Immunologia de la enfermedad de Chagas. Monographias Publicadad No. 7, Universidad de Chile (1957)

129b) PIZZI, P.T., RUBIO, D.M., KREIMM, F. - Riv. Parasitol. 15, 5 7 (1954) - zitiert nach D.L. Belding "Textbook of Parasitology", S. 186 (Appleton - Century - Crofts, New York 1964)

130) PLAIT SOL, B., HOFFEL, J.C., BRUMPT, L., LANGE, J.C., SERINGE, P. - Un cas de trypanosomose vraisemblablement congénitale chez un enfant de deux ans- Presse Med. 74, 2633 (1966) - Paris

131) REISFELD, R.A., WILLIAMS, D.E., CIRILLO, V.J., TONG, G.L. - Characterization of sheep prolactin - J. Biol. Chem. 239, 1777 (1964)

132) REYNOLDS, M. - Measurement of bovine plasma and blood volume during pregnancy and lactation - Physiol. 175, 118 (1953)

133) ROWLEY, D., THONI, M., ISLIKER, H. - Opsonic requirements for bacterial phagocytosis - Nature 207, 210 (1965)

134) ROWLEY, D., TURNER, K.J. - Number of molecules of antibody required to promote phagocytosis of the bacterium - Nature 210, 456 (1966)

135) SABA, TH.M., DI LUZIO, N.R. - Comparative evaluation of the influence of opsonins on hepatic, splenic and pulmonary phagocytosis. - Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 125, 630 (1967)

136) SABA, TH.M., FILKINS, J.P., DI LUZIO, N.R. - Phagocytic and opsonic activities of germfree rats - ibid. p. 634

137) SALGADO, J.A., GARCEZ, P.N., DE OLIVEIRA, C.A., GALIZZI, J. - Revisao clinica atual do primeiro caso humano descrito da doeca de Chagas - Rev. Inst. trop. Sao Paulo, 4, (5) , 330 (1962)

138) SCHALM, O.W. - Vete inary Haematology, 2nd edn. (Baillière, Tindall and Cas ell, London 1965)

139) SCHEMMER, S. - Die Blutmorphologie der Laboratoriumstiere; 2. Aufl., p. 65ff. (J.A. Barth - Verlag, Leipzig 1958)

140) SCHMIDT, H. - Fortschritte der Serologie (Darmstadt 1955; p. 362)

141) SENECA,H., PEER, P. - Immunochemistry of T. cruzi and immunotherapy of experimental Chagas' disease - Antimicrob. Agents Chemotherapy, 560 (1963)

142) SENECA, H., PEER, P. - Immuno - biological properties of Chagastoxin (lipopolysaccharide). - Transact. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 60, 610 (1966)

143) SENECA, H., PEER, P., HAMPAR, B. - Active immunization of mice with Chagastoxin - Nature 209, 309 (1966)

144) SPIEGEL, A. - Über Versuchstiere und Tierversuche - Ärztl. Lab. 11, 337 (1965)

145) SPIEGEL, M.A. - Theory and Problems of Statistics (Schaum Publishing Co., New York 1961)

146) STEINBERG, H., WATSON, R.H.J. - Failure of growth in disturbed laboratory rats - Nature 185, 615 (1960)

147) TUCKER, H.A. - Influence of number of suckling young on nucleic acid content of lactating rat mammary gland - Proceed. Soc. Exp. Biol. Med. 116, 218 (1964)

148) TURNER, C.W., HELMAN, H.A. - Missouri Agricultural Experimental Stati n. Res. Bull. 159, 1931 - zitiert nach 26

149) VELU, H., EYRAUD, R. - Trypanosomiase des chevaux du Maroc. - Infestation d' un jeune chien par l' allaitement - Bull. Soc. Path. exot. 9, 567 (1916)

150) WEBER, E. - Grundriß der biologischen Statistik (VEB G. Fischer, Jena 1964)

151) WERNER, H. - Über den Verlauf von Trypanosomeninfektionen bei Kleinsäugern, über die Frage der placentaren Infektion und Übertragung von Trypanosomen und Antitoxinen durch die Milch - Inaug. Diss. Math.-naturwiss. Fak., Freie Univ. Berlin (1954)

152) WERNER, H. - Über die Frage der placentaren Trypanosomeninfektionen und Übertragung von Trypanosomen und Antikörpern durch die Milch auf das Neu-

geborene - Z. Tropenmed. Parasitol. 5, 422 (1954)

153) WERNER, H. Beobachtungen über den Einfluß auf die Embryonalentwicklung von weißen Mäusen und Goldhamstern - Z. Tropenmed. Parasitol. 6, 150 (1955)

154) WERNER, H., KUNERT, H. - Über die Ursache von congenitalen Trypanosomeninfektionen - Z. Tropenmed. Parasitol. 9, 17 (1958)

155) WHO - WHO : Physiology of lactation - Report of a WHO scientific group. - WHO - World Health Organization, Technical Report Series, No. 305 (Genf, 1965)

156) WIGZELL, H., MÖLLER, G., ANDERSSON, B. - Studies at the cellular level of the 19S immune response - Acta path. microb. scandinav. 66, 530 (1966)

157) WOODY, N.C., WOODY, H.B. - American trypanosomiasis - J. Am. Med. Ass. 159, 676 (1955)

158) WRIGHT, A.E., DOUGLAS, S.R. - Proc. Roy. Soc. (London) Ser. B 72, 357 (1903) - zitiert nach 136

159) YAEGER, R.G., MILLER, O.N. - Effect of malnutrition on susceptibility of rats to T. cruzi - Exp. Parasit. 9,215 (1960)

160) ibid. 10, 227; 232; 238 (1960)

Ich danke Herrn Prof. Dr. A. Herrlich vielmals für die Überlassung des Themas und des Arbeitsplatzes in seinem Institut.
Mein Dank gilt weiterhin Herrn Dr. H. E. Krampitz für viele wertvolle Hinweise sowie Frau W. Krampitz für verständnisvolle technische Assistenz.

Lebenslauf

Als Sohn des damaligen wissenschaftlichen Assistenten und jetzigen Ministerialrates im Bayerischen Wirtschaftsministerium, Dr. Werner Disko, und seiner Ehefrau Gertrud Disko (gestorben am 20. Juli 1966) wurde ich, Rüdiger Disko, am 4. 8. 1937 in München geboren.

Bis zum Jahre 1942 lebten wir in München und zogen dann wegen der Luftangriffe nach Weinheim a.d. Bergstraße, wo ich in die Volksschule eintrat. Noch vor Kriegsende siedelten wir nach Grafrath a.d. Amper über und 1947 nach München.

1949 machte ich die Aufnahmeprüfung in das Münchner Maximiliansgymnasium, wechselte aber drei Jahre später an das Alte Realgymnasium über. Dort legte ich im Juni 1958 die Reifeprüfung ab. Von Oktober 1958 bis Oktober 1959 leistete ich meinen Pflichtwehrdienst als Funker ab.

Im Wintersemester 1959/60 begann ich an der Universität München das Studium der Zoologie und Physik und ergriff im Winterhalbjahr 1960/61 das Studium der Medizin. Im Herbst 1961 legte ich das Vorphysikum, im Sommer 1963 das Physikum ab, um das medizinische Studium am 22. Juni 1967 mit dem Staatsexamen zu beschliessen.

Die freie Zeit, die mir das Studium der Medizin ließ,

verwendete ich dazu, um durch die Teilnahme an Vorlesungen und Kursen an der Universität München meine Kenntnisse in den Fächern Zoologie, Physik, und physikalischer Chemie zu vertiefen.

Seit 1. November 1967 bin ich als Medizinalassistent an der II. Medizinischen Klinik der Universität München (Leiter Prof. Dr. G. Bodechtel) tätig.